

jp06502548/pn

L2 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX COPYRIGHT 2003 THOMSON DERWENT on STN  
ACCESSION NUMBER: 1993-076515 [09] WPINDEX  
DOC. NO. CPI: C1993-033779  
TITLE: Protein expression and secretion system in  
corynebacteria  
for - transformed with cassette contg. signal sequence of  
protein PS1 or 2 in chromosome or plasmid DNA region,  
repetitive synthetic aminoacid polymer and polypeptide  
prodn..  
DERWENT CLASS: B04 D16  
INVENTOR(S): DUCHIRON, F; GUYONVARCH, A; JOLIFF, G; LEBLON, G;  
RELANO,  
PATENT ASSIGNEE(S): P; RENAUD, M; REYES, A O; HAHN, V  
(ORSA-N) ORSAN  
COUNTRY COUNT: 17  
PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	WEEK	LA	PG	MAIN IPC
WO 9303158	A1	19930218	(199309)*	FR	95	C12N015-77
RW: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LU MC NL SE						
W: JP US						
FR 2679921	A1	19930205	(199314)		13	C12N015-77
FR 2679922	A1	19930205	(199314)		19	C12N015-77
EP 551506	A1	19930721	(199329)	FR	95	C12N015-77
R: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU MC NL SE						
JP 06502548	W	19940324	(199417)		95	C12N015-77 <--
US 6027920	A	20000222	(200017)			C07K014-34

APPLICATION DETAILS:

PATENT NO	KIND	APPLICATION	DATE
WO 9303158	A1	WO 1992-FR744	19920729
FR 2679921	A1	FR 1991-9652	19910730
FR 2679922	A1	FR 1991-9870	19910802
EP 551506	A1	EP 1992-917803	19920729
		WO 1992-FR744	19920729
JP 06502548	W	WO 1992-FR744	19920729
		JP 1993-503324	19920729
US 6027920	A	WO 1992-FR744	19920729
	Cont of	US 1993-39028	19930329
	Cont of	US 1995-508761	19950731

FILING DETAILS:

PATENT NO	KIND	PATENT NO
EP 551506	A1 Based on	WO 9303158
JP 06502548	W Based on	WO 9303158

PRIORITY APPLN. INFO: FR 1991-9870 19910802; FR 1991-9652  
19910730

REFERENCE PATENTS: 2.Jnl.Ref; FR 2575492; WO 8809821

INT. PATENT CLASSIF.:

MAIN:	C07K014-34; C12N015-77
SECONDARY:	A61K039-00; A61K039-395; A61K039-40; C07K013-00; C07K015-00; C12N001-21; C12N015-11; C12N015-62;

C12N015-90; C12P013-04; C12P021-02; C12P021-08

INDEX: C12N015-77; C12R001-13

BASIC ABSTRACT:

WO 9303158 A UPAB: 20000412

The sequence encoding aminoacid, polypeptide or protein (I) is in a chromosome or plasmid DNA region where it is transcribed, towards the 5'-end, with at least a part (A) of the sequence encoding the signal sequence of proteins PS1 or PS2. (A) ensures secretion of (I), after translation when the system is included into a corynebacterium.

Bacterial strains contain this expression system, proteins (Ia) contain all or part of the sequence of PS1 or PS2 and antibodies are directed against PS1 and PS2.

Pref. the system contains, apart from the bacterial cell, a secretion cassette comprising (1) a 1st DNA sequence functional for expression in the host; (2) a 2nd DNA sequence encoding (I) and (3) a 3rd DNA sequence,

between the 1st two, encoding (A).

USE/ADVANTAGE - Produces aminoacid sequences, e.g. polymers of Ala-Gln or Ala-Glu-Lys, from which the repeating units may be isolated

by pref. enzymatic treatment. It ensures secretion of the prod. into the culture medium for recovery.

Proteins contg.. (part of) PS1 or PS2, and antibodies directed

against them, are useful in diagnostic kits

Dwg.0/22

FILE SEGMENT: CPI

FIELD AVAILABILITY: AB

MANUAL CODES: CPI: B04-B02B1; B04-B04A1; B04-B04A3; B04-B04C3; B04-

C01; B10-B02; D05-C12; D05-H04; D05-H09; D05-H12

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 告 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-502548

### 第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)3月24日

(51) Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I
C 1 2 N 15/77	Z N A		
A 6 1 K 39/00	A	9284-4 C	
39/395	A	9284-4 C	
	H	9284-4 C	
C 1 2 N 1/21		7236-4 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 32 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号	特願平5-503324
(86) (22)出願日	平成4年(1992)7月29日
(85)翻訳文提出日	平成5年(1993)3月30日
(86)国際出願番号	PCT/FR92/00744
(87)国際公開番号	WO93/03158
(87)国際公開日	平成5年(1993)2月18日
(31)優先権主張番号	91/09652
(32)優先日	1991年7月30日
(33)優先権主張国	フランス(FR)
(31)優先権主張番号	91/09870
(32)優先日	1991年8月2日
(33)優先権主張国	フランス(FR)

(71)出願人 オルサン  
フランス国パリ、リュ、パリュ、16

(72)発明者 ジョリフ、グワンナエル  
フランス国パリ、リュ、トリュフォー、48

(72)発明者 ギヨンバルシュ、アルメル  
フランス国ラーイ、レ、ローズ、アブニ  
ュ、フルーケ、21

(72)発明者 レラノ、ピュリフィカション  
フランス国フォントネ、オ、ローズ、リ  
ュ、ピエールレ、12

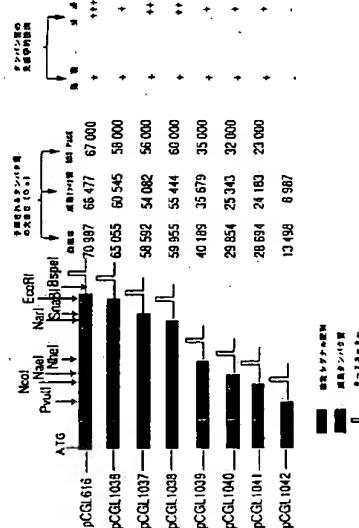
(74)代理人 岸理士、佐藤、一雄 (外2名)

最終頁に統ぐ

(54)【発明の名称】 特にコリネバクテリア中で用いることのできる蛋白質の発現および分泌系

(57) 【要約】

コリネバクテリアによるアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現および分泌のための系である。この系は、そのアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードする配列が染色体またはプラスミドDNAの領域内に置かれ、その配列が、蛋白質P S 1またはP S 2のシグナル配列をコードする配列の少なくとも1つの部分（この部分はコリネバクテリア菌株へこの系が取り込まれた時、翻訳後のその蛋白質の分泌を保証する）とともに5'末端に向かって転写されることを特徴とするものである。



添書(内容に変更なし)

## 請求の範囲

1. コリネバクテリア菌体による所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現および分泌のための系であって、上記アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードする配列が、染色体またはプラスミドDNAの領域内に位置しており、この領域内では該配列が、蛋白質PS1またはPS2のシグナル配列をコードする配列の少なくとも1つの部分とともに5'末端に向かって転写され、該部分は、該系がコリネバクテリア菌株に取り込まれた時、翻訳後の上記蛋白質の分泌を保証するものであることを特徴とする、系。

2. 次の構成から成るコリネバクテリアの発現および分泌系であって

- コリネバクテリア菌株と、
- 上記コリネバクテリア菌株中の発現のための第一機能性DNA配列、アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質をコードする第二DNA配列、および上記第一および第二DNA配列の間に挿入された第三DNA配列を含む分泌カセットとを含んでなり、上記第三DNA配列は、上記コリネバクテリア菌株により上記アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質の分泌を保証するPS1またはPS2から選ばれた蛋白質の要素をコードするものである、系。

項1～9のいずれか一項記載の系。

11. 所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現および分泌が、温度、培養液および糖の性質によって制御される、請求項1～10のいずれか一項記載の系。

12. コード配列が1つ以上の反復アミノ酸のポリマーをコードする配列である、請求項1～11のいずれか一項記載の系。

13. 反復配列における反復単位が、COOH末端部において正または負に荷電したアミノ酸を含んでなる、請求項1～12のいずれか一項記載の系。

14. ポリペプチドのイオン特性がその単體を可能にする、請求項1～13のいずれか一項記載の系。

15. 荷電したアミノ酸が、特定のプロテアーゼによりペプチドの切断をそのレベルで可能にする、請求項1～14のいずれか一項記載の系。

16. 荷電したアミノ酸が特定のカルボキシペプチダーゼにより除去できる、請求項1～15のいずれか一項記載の系。

17. マーカー遺伝子がc-e1A遺伝子である、請求項1～16のいずれか一項記載の系。

18. コード配列が、第17図に対応するg.d.h.Aのすべてまたは一部を含んでなる、請求項1～17のいずれか一項記載の系。

特表平6-502548 (2)

3. コリネバクテリアの菌株がBrevibacterium属に属するものである、請求項1または2に記載の発現および分泌系。

4. 発現のための第一機能性DNA配列がプロモーターおよびリボソーム結合部位を含んでなる、請求項1～3のいずれか一項記載の発現および分泌系。

5. 分泌カセットがコリネバクテリア菌株中で機能する板型起座を含む自律的に複型するプラスミドにより保持されている、請求項1～4のいずれか一項記載の発現および分泌系。

6. 分泌カセットがコリネバクテリア菌株の染色体へのその組込みを保証するDNAの要素を含む、請求項1～5のいずれか一項記載の発現および分泌系。

7. 上記第三DNA配列がPS1またはPS2のシグナル配列のすべてまたは一部を含んでなる、請求項1～6のいずれか一項記載の発現および分泌系。

8. コード配列の端部の翻訳停止配列、転写停止配列およびマーカー遺伝子をさらに含んでなる、請求項1～7のいずれか一項記載の発現および分泌系。

9. 所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードする配列が、同一相でc.s.p.1またはc.s.p.2遺伝子に挿入されている、請求項1～8のいずれか一項記載の系。

10. PS1またはPS2配列が切形である、請求

19. 発現のための機能性DNA配列が、c.s.p.1、c.s.p.2またはg.d.h.Aの発現要素から選ばれるものである、請求項1～18のいずれか一項記載の系。

20. 発現が塩、代謝産物および糖の濃度に依存する、請求項1～19のいずれか一項記載の系。

21. コード配列の発現前において、プロモーターが、c.s.p.1、c.s.p.2またはg.d.h.Aプロモーターから選ばれるものである、請求項1～20のいずれか一項記載の系。

22. マーカー遺伝子がlacZ遺伝子である、請求項1～21のいずれか一項記載の系。

23. 請求項1～22のいずれか一項記載の発現および分泌系を使用して得られる、バクテリア菌株。

24. 菌株がコリネバクテリアである、請求項23に記載の菌株。

25. 菌株がプレビバクテリアである、請求項24に記載の菌株。

26. 菌株がBrevibacterium lactofermentumである、請求項25に記載のコリネバクテリア菌株。

27. 所定の蛋白質が、その固定作用を有するPS1またはPS2部位により壁上に固定されている、請求項23～26のいずれか一項記載のコリネバクテリア菌株。

28. 菌株が、その壁上に固定されたPS1または

P S 2 の抗原エピトープを有する、請求項 23 ～ 26 のいずれか一項記載のコリネバクテリア菌株。

29. アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質を生成する方法であって、請求項 23 ～ 28 のいずれか一項記載のコリネバクテリア菌株を培養液中で培養し、第二 DNA 配列が上記アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードし、培養後、上記生成物を、培養液および/またはバクテリア濃縮物から任意に分離することを含んでなる、方法。

30. P S 1 または P S 2 と融合または別な方法で結合した所定の蛋白質が、表面活性剤を使用してバクテリア細胞から分離される、請求項 29 に記載の方法。

31. P S 1 または P S 2 配列のすべてまたは一部を含む、蛋白質。

32. P S 1 または P S 2 の抗原部位を含む、蛋白質。

33. 抗原要素として、請求項 31 または 32 記載の蛋白質。

34. P S 1 または P S 2 に対する、抗体。

特にコリネバクテリア中で用いることのできる蛋白質の発現および分泌系

本発明は、特にコリネバクテリア中で使用することのできる蛋白質の発現および分泌系、この系を使用する方法、およびこれら発現系に関連した斬新な蛋白質に関するもの。

コリネバクテリアとは、さまざまな菌株によって表示される不規則な形態の一群のグラム陽性バクテリアのことである。

グラム陽性細胞は、外部培地への蛋白質の分泌を容易にする簡単な構造を有するという事実にもかかわらず、コリネバクテリアによる蛋白質の分泌は、今日迄あまり広く研究されていない。毒性\*の溶原性ファージ (Smith 1980: J. Bacteriol. 141, 1142 頁; Saito 等、1980: J. Bacteriol. 141, 184 頁; Greenfield 等、1983: PNAS USA 80, 6853 頁) に感染した Corynebacterium diphtheriae の特定の菌株によって分泌されたジフェリアル酸および Corynebacterium glutamicum (V. Liebl 等、A.S. Sinkay, 1986: バクテリアの遺伝子学および生物工学、2巻、383-388 頁) による DNA アーゼの分泌に伴う遺伝子のスクレオチド配列の研究が報告されているに

すぎない。

米国特許第 4,965,197 号は、上記 DNA アーゼの下で Corynebacterium に用いることのできる発現および分泌系について述べているが、この場合の蛋白質は主成分ではなく、またこれら条件の下では、対応する分泌系はあまり重要ではないように思われる。

従って、本発明は、特定のコリネバクテリアの培養液上澄み中に高い割合で存在する二つの蛋白質の分泌のための要素を含むコリネバクテリア型のバクテリアにおける発現および分泌系に関するもの。

本発明は、特にコリネバクテリア菌株により所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現および分泌のための系であって、上記アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードする配列が、染色体またはプラスミド DNA の領域内に位置しており、この領域内では上記配列が、蛋白質 P S 1 または P S 2 のシグナル配列をコードする配列の少なくとも 1 つの部分とともに 5' 端部に向かって転写され、上記部分は、系が上記コリネバクテリア菌株に取り込まれた時、翻訳後の上記アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の分泌が保証するものであることを特徴とする系に関するもの。

さらに、本発明は、コリネバクテリアの発現および分泌系であって、

- コリネバクテリア菌株と、

- 上記コリネバクテリア菌株中の発現のための第一機能性 DNA 配列、アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質をコードする第二 DNA 配列、および上記第一および第二 DNA 配列間に挿入された第三 DNA 配列を含む分泌カセットとを含んでなり、上記第三 DNA 配列は、上記コリネバクテリア菌株により上記アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質の分泌を保証する P S 1 または P S 2 から選ばれた蛋白質の要素をコードするもの、である系に関するもの。

まず、本発明の構成において、「コリネバクテリア」とは Corynebacterium 属の菌株のみならず Brevibacterium のような同属のバクテリアの菌株をも指すものと理解すべきである。

本発明の発現系はコリネバクテリア中で自動的に複製するプラスミド中に存在し、この場合、プラスミドは、例えば Corynebacterium の菌株中で機能する複型起源、即ち複型起源 P B L 1 を含むが、また上記発現系は、染色体組込み用に特別に設けられた複製不能なプラスミドに保持することもでき、この場合、プラスミドは染色体組換えおよび組込みを可能にする要素を含んでなる。この組込みの場合、発現系は最終的に上記バクテリアの染色体中に存在する。

特に、染色体組込みの場合、P S 1 をコードする遺伝子 C S P 1 または P S 2 をコードする遺伝子 C S P 2 へ

の異種DNA配列の挿入は、対応する菌株の成長に影響を及ぼさないことが実証されている。これらの条件の下では、挿入したコード配列の発現による生成物を発現／分泌させるために、CSP1またはCSP2の相の中でアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードする配列を一体化することが可能である。

コリネバクテリア菌株中の発現のための機能性DNA配列としては、相同発現用要素および異種発現用要素の両方を挙げることができる。即ち、これら要素は宿主のバクテリア中にすでに存在している要素、またはこれとは異なり、異なるバクテリアから導入される要素でもよい。

これら発現要素は、プロモーターおよびリボソーム結合部位を本質的に含んでいるが、他の要素、特に発現を調整するタイプの要素であることも可能である。

コリネバクテリア中で使用することのできる発現要素としては、強力なプロモーターであるP<sub>lac</sub>、P<sub>lac</sub>Cプロモーター、I<sub>P</sub>T<sub>G</sub>により導入され且つE. coliのようなコリネバクテリア中で作用することが解っているI<sub>P</sub>T<sub>G</sub>/I<sub>lac</sub>Cハイブリッドが特に使用される。しかしながら、他のプロモーター、例えば下記のプロモーター、またはコリネバクテリアの構造遺伝子発現のための他の要素、例えばg<sub>d</sub>h<sub>A</sub>プロモーターを使用することが可能である。また、例えば、発現要素、特に本発明の範囲内にあると認

用する上記のような複数型起原をコリネバクテリアと異なるバクテリア中で生成する異種要素、またCorynebacteriumへの転移を容易にする複数遺伝子のような他の要素を含んでいてもよい。

もちろん、マーカー遺伝子は、コリネバクテリア中で作用する限りにおいて、様々な形のものであってよく、耐性のような正または負の選択用の遺伝子であってよい。しかしながら、現在の研究状況の下では、これら遺伝子は容易に入手できない。従って、CMC<sup>+</sup>表現型を与えるClostridium thermocellumセルロース(c<sub>e</sub>1A)用のc<sub>e</sub>1A遺伝子が好ましく使用されるが、他のマーカー遺伝子、特にE. coliのI<sub>lac</sub>Zを使用することも可能である。

マーカー遺伝子がc<sub>e</sub>1Aである場合、B<sub>st</sub>XIのような適切な制限部位へのコード配列の挿入後、

CMC<sup>+</sup>特性のために形質転換バクテリアが選択される。

本発明の方法においては、特にマーカー遺伝子とコード配列との間に制限部位を配置することにより、構造の点検後にマーカー遺伝子を容易に除去できことが好ましい。

コード配列は自然のもの、合成のもの、またはこれらの混合したものでもよい。

本発明の発現および分泌系は、もちろん工業的に重要な生成物の生成を保証するように特別に設計されている。

#### 特表平6-502548 (4)

められる蛋白質PS1および／またはPS2の一方のプロモーターを使用することも可能である。

また、発現要素は遺伝子の下流領域の発現の調整を保証するDNA配列を含むこともできる。

良好な発現を保証する要素として、コード配列の末端に1つ以上の停止コドンの形の翻訳停止要素、または転写停止要素を配置することが可能である。

分泌を保証する要素としては、上記したように、分泌特异性を変更または喪失することなしに、蛋白質PS1またはPS2の一方のシグナル配列のすべてまたは一部並びにこれら配列と等価の配列を挙げることができる。

最終的には、点突然変異のような公知の技術を用いて、同様の分泌特异性を保持しながら分泌配列を僅かに変更することが可能であり、従って、本発明はこれら等価の配列をも含むものである。

結論として、本発明による発現系は他の要素、特に転写ターミネーター、例えば蛋白質PS1および／またはPS2用、もしくはg<sub>d</sub>h<sub>A</sub>用のターミネーターのような要素を含んでいてもよい。

場合によっては、発現および分泌配列に蛋白質PS1のすべてまたは一部を導入して、これらの条件の下で分泌および発現レベルを改善することのできる融合蛋白質を得ることも有利である。

本発明による発現系は、例えば、E. coli中で作

従って、コード配列は、工業的に重要なペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質を特別にコードする。しかしながら、このコード配列は、工業的に重要な蛋白質を直接的にコードするのではなくて、工業的に重要なアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の成熟および／または生成を必要とする蛋白質をコードする配列であってもよい。

本発明の方法はアミノ酸配列、特に反復配列の発現のために特別に設計されており、従って、これらは主に合成配列である。

これら種々の生成物をコードするこの第二DNAは、また分泌生成物の成熟を保証するように設計された特定の要素を含んでいてもよい。

合成配列の場合、コード配列を選択することにより次の構成が得られる。

—アミノ酸配列：

—(a<sub>1</sub>…a<sub>n</sub>)<sub>n</sub>型のn個の反復単位を有する反復アミノ酸配列；

—COOH-末端位置a<sub>n</sub>に正または負に帯電したアミノ酸を含む反復配列。このアミノ酸は遺伝子発現を改善するが、次の事項を有利に達成し

(I) 嘘しいイオン性によりポリペプチドを導離すること；

(II) 特定の蛋白質によりポリペプチドを(a<sub>1</sub>…a<sub>n</sub>)<sub>n</sub>単位に切断すること；

(111) 必要ならば、特定のカルボキシペプチダーゼにより末端アミノ酸  $\alpha_x$  を除去すること。  
所望の利点を与えるアミノ酸を  $NH_2$  または  $COOH$  - 末端部分  $\alpha_1$  または  $\alpha_x$  に含有する反復配列。実施例において、発現配列は構造 ( $\alpha_1$  -  $gln$ )<sub>20</sub> および ( $\alpha_1$  -  $gln$  -  $lys$ )<sub>10</sub> のポリペプチドをコードする。 $\alpha_1$  -  $gln$  または  $\alpha_1$  -  $gln$  -  $lys$  配列はその後の酵素処理により放出することができる。酵素処理または化学的処理により放出できる  $\alpha_1$  -  $gln$  -  $Tyr$  または  $\alpha_1$  -  $gln$  -  $Met$  のようなこの種の他のポリマーを生成することもできる。

コード配列のコドンの選択は、コリネバクテリア中の発現に影響を及ぼし、約 50 - 60% の GC 含有量を有する配列を生成することが好ましい。

この例の場合、( $AQ$ )<sub>20</sub> をコードする配列は、 $G-C-X-C-A-G$  であり、ここで X は A, T, C または G であり、実際これらコドンはアラニンに対して好ましくないが、一方 CAG コドンはグルタミンに対して明らかに好ましい。この場合、GC の含有量は約 75% であり、これは限定的である。従って、含有量を 55% まで減少させるために、第 3 番目は A および T が豊富な 3 つのアミノ酸を含むポリマーの使用が考えられる。

$Tyr$ ,  $Lys$  および  $Met$  はこれらコドンの最初の

2 つの塩基中に 2 つの A または T を有しており、従って、GC の含有量は 75% から約 60% に減少し、コリネバクテリア中に見られる GC の含有量に接近する。さらに、もちろん、グルタミン (Q) の  $COOH$  - 末端位置における工業的に重要なこれら 2 つのアミノ酸は、開発され且つ実在するものである。

本発明は、また上記発現および分認系を含むコリネバクテリア菌株に関しており、特に、この場合、上記菌株は *Brevibacterium*、特に *Brevibacterium lactofermentum* 菌株である。

最後に、本発明は、アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質を生成する方法であって、上記コリネバクテリアの形質転換株を培養液中で培養することからなり、第二 DNA 配列が上記アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質をコードし、且つ上記生成物が培養液から任意に分離されることを特徴とする方法に関する。実際、この方法により、有用な生成物が分離された。従って、この生成物は、この生成物自身を公知の方法で単離することのできる培養液中に存在する。これら公知の方法は例えばクロマトグラフィーまたは選択的沈殿のような分離方法であり、この選択的沈殿は、生成する分子の特性に適応したものであることが明らかに必要である。

また、バクテリア濃縮液を分離し、つぎに、例えば表面活性剤を用いて、この濃縮液から PS 1 または PS 2

と融合または別の方法で結合した所定の蛋白質を分離することも可能である。実際、PS 1 および PS 2 は蛋白質であり、このシステムにより分認した蛋白質の一部は、既に固定したままであり、このことは、これら蛋白質の分離を容易にする。なぜならばバクテリアは特定の洗浄剤では溶解しないからである。

プラスミドによるコリネバクテリアの形質転換は、エレクトロポレーション (Bonamy C.、Guyonvarch A.、Reyes, O.、David F. および Leblon G. *PEMS Microbiology Letters*, 68, 283-270, (1990)) または他の好適な方法により行なうことが好ましい。

アミノ酸、ペプチドおよび/または蛋白質の生成を可能にする免酵条件は、得られた生成物の種類並びに使用した特定の菌株に明らかに依存し、当業者の知識に従って各菌株に対して明確に決定しなければならない要素がある。

また、本発明は、csp1、csp2 および gdhA、これら 3 つの遺伝子のすべてまたは一部の発現用シグナルのすべてまたは一部を含む発現系、並びにこの種の系を発現する菌株、特にコリネバクテリアの菌株に関する。

上記構成物を使用する方法において、所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現/分認は、温度、培養液および/または SP 1 および PS 2 用の部分の性質、および塩 (特に  $NH_4^+$ ) の濃度、代謝産物 (グルタミ

ン酸塩) および gdhA を有する系用の糖分 (グルコース/フルクトース) によって調整される。

また、本発明は、SP 1 または PS 2 配列のすべてまたは一部を含む蛋白質、特にこれら蛋白質の 1 つ以上の抗原部位を含む蛋白質に関する。上記蛋白質は、また代表的な要素として、特に診断セットとして、対応する抗体と使用することができる。

また、本発明は、所定の蛋白質が下記固定作用を行なう SP 1 または PS 2 部分の墨に固定され、また SP 1 または PS 2 の抗原エピトープが墨上に露呈されているコリネバクテリア菌株に関する。

下記の実施例は本発明の他の特徴および利点を示すことを意図しており、これら実施例はけっして本発明を制限するものではない。

第 1 図はプラスミド pCGL612 の図であり、このプラスミドは、蛋白質 PS 1 を合成する全 csp1 遺伝子を含む *C. melassecola* ATCC17965 の 2.6 - kb フラグメントを含む pUN121 (Nilsson, B., Uhlen, M., Josephson, S., Gatzenbeck, S.,および Phillipson, L. (1983), An improved positive selection plasmid vector constructed by oligonucleotide mediated mutagenesis (オリゴヌクレオチド介して突然変異誘発により生成された改良した正の選択プラスミドベクター)、*Nucleic Acids Res* 11: 8019-8029) から得

導されたものである。

第2図は、*Corynebacterium melassecola* ATCC 17965と呼ばれている*Corynebacterium glutamicus*のcsp1遺伝子のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を示す。ヌクレオチドの番号は、図面の右側に記載されている。反復ヌクレオチド配列は四角で囲ってある。予想されるSD配列には下線が付してある。転写ターミネーターおそらくは対応する24-bpパリンドロームは、向かい合う矢印で示されている。この配列は、アクセス番号X66078の下でEMBLヌクレオチド配列データバンクで見ることができる。

第3図はcsp1を保有する*C. melassecola* ATCC 17965の配列DNA領域の制限地図である。

第4図は、*C. glutamicus*の蛋白質PS1および*Mycobacterium*の抗原85複合体の蛋白質の配列の整列状態を示している。85B M. K. は*M. kansaii* (NIPSG16235) の抗原85-Bを表わす。85B M. b. は*M. bovis* (NIPSC88179) の抗原85-Bを表わす。85B M. I. は*M. leprae* (EMBLX80934) の抗原85-Bを表わす。85C M. t. は*M. tuberculosis* (EMBLX51229) の抗原85-Cを表わす。85A M. b. は*M. bovis* (NIPSA128544) の抗原85-Aを表わす。85A M. t. は*M. tuberculosis* (NIPSI60062) の抗原85-Aを表わす。配列は「Genetics Computer

ラスミドを示している。

ここでは、pCGL616から説導したベクターの図、期待された蛋白質の大きさの明確、および抗PS1ポリクロナール抗体を使用しウエスタンプロットによる検出(+)または非検出(-)を示している。

第8図はプラスミドpCGL1030の構造を示している。図の領域Aはcsp1およびこれに続くDNA領域を含んでおり、このDNA領域はPS1のシグナル配列およびその成熟配列の最初の30個のアミノ酸に対応している。

第9図はプラスミド1031の構造を示している。領域Aは第8図に説明されている。ps1およびEGAの間の結合領域は連続配列されており、この配列の詳細が示されている。

第10図はプラスミド1032の構造を示している。領域Aは第8図に説明されている。PS1、(AQK)10およびEGAの間の結合領域は連続配列されており、この配列の詳細が示されている。

第11図はプラスミド1033の構造を示している。領域Aは第8図に説明されている。PS1、(AQ)19およびEGAの間の結合領域は連続配列されており、この配列の詳細が示されている。

第12図は、*Corynebacterium melassecola* ATCC 17965と呼ばれている*Corynebacterium glutamicus*

Group」(米国、ウイスコンシン大学)のFASTAプログラムを用いて整列した。残基の数は各行の始めに各蛋白質に対して与えられている。異なる各蛋白質の間に見られる同様のアミノ酸残基は四角で囲ってある。同様であると考えられる残基は次の通りである。酸またはアミド(D, E, N, Q)；塩基(H, K, R, )；極性(P, A, G, S, T)；無極性(I, L, M, V)および芳香族(F, W, Y)。7つの蛋白質の間の同じアミノ酸残基は、関係した残基の上の星印によって表示されている。

注意：各抗原に対して、アクセス番号は上記データバンクの名前と一緒にカッコ内に表示されている。

第5図はcsp1遺伝子の切断を示している。切断したcsp1遺伝子の染色体への組込み状態が示されている。pCGL613'は*C. glutamicus*中で複製不可能であり、これはaphA3遺伝子(Ks)によって切断されたcsp1(黒色領域)を含んでいる。Wtは*B. lactofermentum* 15野生型を表わし、Δcsp1は切断csp1を含む組み込み体である。

第6図はプラスミドpCGL616の構造を示している。プラスミドpCGL616は、*C. glutamicus*のcsp1遺伝子を有するプラスミドpCGL125に対応する。

第7図は切形蛋白質PS1を合成することのできるア

のcsp2遺伝子のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を示す。ヌクレオチドの番号は、図面の右側に記載されている。予想されるSD配列には下線が付してある。転写ターミネーターおそらくは対応する24-bpパリンドロームは、向かい合う矢印で示されている。

第13図はcsp2を保有する*C. melassecola* ATCC 17965の配列DNA領域の制限地図である。

第14図は*C. glutamicus*におけるcsp2遺伝子の切断を示している。切断された遺伝子の染色体組込み状態が示されている。*C. glutamicus*中で複製不可能であるプラスミドpCGL830は、aphIIIにより切断されたcsp2遺伝子を有している。aphIIIおよびcsp2遺伝子の転写方向は、プラスミドpCGL830上の矢印によって表わされている。Wtは*B. lactofermentum* 15野生型を表わし、csp2:aphIIIは切断csp2遺伝子を有する組み込み体である。

第15図は温度の関数としてPS1のトランスロケーションを示している。34℃の指数増殖期(OD650=1)における培養液の10mlを1分間<sup>35</sup>Sメチオニン(37TBq/mmol, 1.6nM最終濃度)で標識した。パルスの終了時に、クロラムフェニコール(100μg/ml)および次に<sup>32</sup>Sメチオニン(最終濃度0.5mM)を加えた。アリコートの1mlを除去し、所定の温度まで

速やかに冷却した。この温度で30分間培養を続け、PS1の分泌型留分を抽出した。次に、この抽出物をSDS-PAGEおよびオートラジオグラフにかけた(a)。バンドの強度は、デンシトメトリーにより決定され(b、左側の軸)且つ34で100を基準にして任意の単位で表わされている。トランスロケーションは蛋白質の相転移の関数である。

第16図はg d h A遺伝子の制限地図である。

第17図はC. melassecolaのg d h A遺伝子を含むNhe I-Bgl Iフラグメントの完全な配列を示す。

第18図はp C GL 14 1およびp C GL 14 2の構造、およびg d h A遺伝子のプロモーターとlac Z遺伝子との間を融合するベクターを示す。

第19図は各構造において用いられるオリゴヌクレオチドを示す。

第20図はp PROK (AQ) 20 c e l Aの構造を示す。

第21図はp tacとc e l Aとの間に合成遺伝子が配置されている構造を詳細に示しており、a)はp tacの指令下にc e l Aを配置した構造であり、b)はポリペプチドAQの導入後の予想できる構造である。

p tac: lacプロモーター

RBS: リボソーム結合部位

■: ポリペプチドAQに等価なBst XI部位に導入したヌクレオチド(DGF5、DGF6)

### 特表平6-502548 (7)

他の可能な遺伝子(DGF1、DGF2)との融合を可能にするc e l A遺伝子の5末端における合成配列

■: ポリペプチドAQに等価なBst XI部位に導入したヌクレオチド(DGF5、DGF6)

□: EGAのシグナル配列の一部に等価なDNAの配列

▨: EGAのコード配列に等価なDNAの配列

□: 転写ターミネーター

P: EGAのシグナル配列に属する最初のアミノ酸

第22図はp C GL 12 5の構造を示す。

実施例1. 培養液上澄みおよびCorynebacterium glutamicumの壁におけるPS1およびPS2の同定

現在、Corynebacterium glutamicum菌株(Jones, D. L.およびCollins, W.D. (1988), Irregular nonsporing Gram-Positive rods. In Berger's Manual of Systematic Bacteriology, WilliamsおよびWilkins(eds)、Baltimore、2巻、1261-1434頁)と再定義されているCorynebacterium melassecola ATCC 17965菌株の培養液上澄みの変性条件(SDS-PAGE)

(Laemmli, U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4、Nature、227: 680-685)の下におけるポリアクリルアミドゲル分析によれば、分子量がそれぞれ

約67000および63000のPS1およびPS2の2つの主要蛋白質が明示される。PS1およびPS2の濃度は、バクテリアの成長曲線に従い、これらの定期相において最大値に達する。これら蛋白質、特にPS2の大部分の分泌留分は、バクテリアの壁中にも存在している。壁からPS1およびPS2を抽出するためには、バクテリアを殆ど溶離することのないバクテリアのSDS処理が使用される。従って、PS1およびPS2の最大濃度を得るために、2つの分泌留分、培養液上澄みおよび細胞壁留分を蓄積し、PS1およびPS2が高い割合で存在する最終標品を得ることができる。ポリクロナール抗体はPS1およびPS2に対して生成され、2つの蛋白質間に免疫交差反応は存在せず、このことは、これら蛋白質が異なることを効果的に示している。PS1およびPS2との強い免疫交差反応性を有する蛋白質は、Brevibacterium lactofermentum 15(Bonassie, S., Oreglia, J., Trautvetter, A., およびSicard, A.M. (1980), Isolation and characterization of a restriction and modification deficient mutant of Brevibacterium lactofermentum. PEMS Microbial letter 72:143-146)、Brevibacterium lactofermentum ATCC 21086およびBrevibacterium flavum ATCC 14067菌株のようなCorynebacterium melassecola ATCC 17965に関するバクテリア

株の培養液上澄み中に見いだされた。PS1およびPS2は、インペルターゼ、ペクチナーゼ、ヌクレアーゼ、コラゲナーゼ、アミラーゼ、バクテリオシン、エンドグルカナーゼおよび広域スペクトルプロテアーゼ活性を含む幾つかの酵素活性についてテストされた。これらの酵素活性はPS1またはPS2に包含されていなかった。

実施例2. Escherichia coliにおけるPS1のシグナルペプチドの作用についての証明(第1図)

プラスミドp C GL 6 1 2(第1図)により保持されたc sp 1遺伝子E. coli TG1中で発現されると、抗PS1抗体とこの粗抽出物のウエスタンプロット分析により、C. melassecolaの培養液上澄み中に存在する蛋白質PS1と同じ分子量を有する主要蛋白質の存在が明らかになる。わずかに大きな分子量を有する少量の蛋白質もまた検出される。実際、主要な蛋白質バンドは、PS1(シグナル配列を有せず)およびPS1(シグナル配列を有する)の前駆体型に対する割次の蛋白質バンドに対応している。

実際、第1の実験において、没液ショック(Heppel, L.A. (1967), Selective release of enzymes from bacteria. Science 150: 1451-1455)により粗抽出菌株E. coli TG1(p C GL 6 1 2)のペリプラズミック蛋白質(分泌した酵素)の放出および抗-PS1抗体使用のウエスタンプロット法による放出蛋白質含有

量の検出は、主要蛋白質のみを示す。この菌株のイソクエン酸塩代ヒドロゲナーゼ活性 (Shioi, I. および Udagawa, K., (1978), Enzymes of the glutamate and aspartate synthetic pathways in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*, J. Bacteriol. 134: 647-657) は、溶菌をモニターする方法で測定した。この実験において、この溶菌は 1% 未満であると見扱もられた。このことにより、結論として主要蛋白質バンドは PS 1 の熟成型に対応し、且つこの蛋白質は *E. coli* の細胞膜を横切って放出される。

#### 第 2 の実験において、組換え菌株 *E. coli* 1

TG 1 (pCGL612) の粗抽出物は、蛋白質の合成を抑制するためにクロラムフェニコールの添加の前後に抗-PS 1 抗体使用のウエスタンプロット法により分析された。副次的バンドは蛋白質合成の抑制後次第に消える。クロラムフェニコール CCCP (m-クロロフェニルヒドロソシンアン化カルボニル) の添加 5 分前に、細胞膜を横切る移動力を消散させるプロトノフォア (Protonophore) が加えられるならば、この副次的 PS 1 のバンドは消失しない。従って、副次的 PS 1 のバンドの消失は、プロテアーゼによる分解の結果ではない。蛋白質合成の抑制後のその漸進的消失およびペリプラズムからのその不在は、膜内に位置されているペプチダーゼシグナル配列および細胞膜を横切るそのトランスロケ

ーションによるこの前駆体形態の成熟の仮説に一致している。また、この結果は、*E. coli* において、PS 1 の成熟が生体内のプロトン移動力に依存していることも示している。

#### 実験例 3. PS 1 をコードする csp1 遺伝子のヌクレオチド配列

上流領域の csp1 と呼ばれている PS 1 - コード遺伝子を含む 2547 塩基対 フラグメントの配列決定を行った。ヌクレオチド配列は第 2 図に示されている。(配列番号: 1)。第 3 図はこの配列領域の創限地図を表している。

コンピュータ分析を行なうことにより、657 個のアミノ酸に対応する 1971 個の塩基対の読み取り枠が確認された。

翻訳 (GAGAAGGAAAAACTTCATG) および転写 (TACATA (-35) および TAAAGAT (-10) を開始する推定シグナルが確認された。上記リボソーム - 結合部位から抽出した AGAAGGA 配列は、グラム陽性型バクテリア、*Staphylococcus aureus* および *Streptomyces lividans* (5' - G A U C A C C U C C U U U C U O H - 3') の rRNA の 3' 端部に対して相補的である (アンダーライン) (McLaughlin, J.R., Murray, C.L., および Rabinovitz, J.C. (1981), Unique features of the

ribosome-binding site sequence of the Gram positive *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -lactamase gene., J. Biol. Chem. 256: 11283-11291) (Bibb, M.J. および Cohen, S.V. (1982), Gene expression in *Streptomyces*: Construction and application of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*, Mol Gen Genet 187: 265-277)。翻訳開始コドンの前方の 5' における DNA 領域は、2 つのヌクレオチド配列 AAAAGTTATCCACAG および ATTGAAAAAA を含んでおり、これら配列のそれぞれは、最初の場合 28-42 および 70-84 において、二度目の場合 100-108 および 171-179 において二度繰返されている。これら 2 つの配列は csp1 遺伝子の転写の調節範囲内に含まれる。

分泌シグナルの場合、蛋白質の NH<sub>2</sub> 末端における配列は、グラム陽性型バクテリアのシグナル配列の特徴を表わしている (Watson, M.E.E. (1984), Compilation of published signal sequence, Nucleic Acids Res. 12: 5145-5164)。このシグナル配列は、NH<sub>2</sub>-末端位置における過剰の正電荷 (最初の 18 個のアミノ酸中に正電荷を有する 7 個のアミノ酸)、それに続いて過剰の無極性アミノ酸 (次の 23 個のアミノ酸中に 18 個のアミノ酸) を有する配列、さらにそれに続くシグナル配列切断部位の 2 つの推定アミノ酸配列 (28-32 の位置に

おける pro-thr-alanine-alanine) (39-43 の位置における pro-methionine-alanine-serine-alanine) を含んでいる。シグナル配列切断部位のこれら推定アミノ酸配列の間で、後者の配列 - 39-43 の位置における pro-methionine-alanine-serine-alanine は、最も確立が高いように思える。実際、蛋白質 PS 1 は、2 つの異なる方法 (実験例 5 を参照) を用いて電気泳動の結果が同じになるまで、*Corynebacterium glutamicum* の培養液上澄みから精製され、得られた標品は、エドマン分解法によりアミノ-末端配列を決定するために用いられた。5 neol の純粋な蛋白質を使用したが、シグナルは得られなかった。2 つの精製方法が使用されたので、蛋白質 PS 1 が生体内で遮断され、この遮断は使用した精製技術の結果ではないと思われる。提案された第 2 の切断配列は、成熟配列の最初のアミノ酸としてグルタミン (44 の位置) を明示していると思われ、このグルタミンはエドマン技術によりビログルタミン酸に容易に変換されて、蛋白質のアミノ-末端配列化を不可能にする。

ribosome-依存型の推定ターミネーター部位は、3 つの停止コドン ochracyanophoresa から 55 個のヌクレオチドの遺伝子の 3' 領域中に見いだされる (Rosenberg, M., および Court, D. (1979), Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA

実施例4. *Corynebacterium glutamicum*のPS1と  
*Mycobacterium*の抗原85複合体の蛋白質との間の配列  
相異性(第4図)

transcription. Annu Rev Genet 18: 319-358). このヘアピン構造の△Gは-35.7 kcal/molに等しい。(Freier, S.M., Kierzek, R., Jaeger, J.A., Sugimoto, N., Caruthers, M.H., Neilson, T. および Turner, D.H. (1986). Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. Proc Natl. Acad. Sci. USA 83: 9373-9377).

読み取り枠中に含まれる657アミノ酸に対応する計算上の分子量は70874. しかしながら、最も可能性の高いシグナル配列(アミノ酸の42と43との間の切断部位)の分子量は4411であり、このことは成熟蛋白質に対して66463の計算上の分子量が与えられ、この値は、変性ポリアクリルアミドゲルに基づいて計算された67000の値にかなり近似している。

配列の特徴をまとめると、次の通りである：

239 ~ 244 T A C A T A (シグナル - 35)  
269 ~ 274 T A A G A T (シグナル - 10)  
405 ~ 414 G A G A A G G A A A リボソーム-結合部位)

420 ~ 2390 コード配列

420 ~ 548 分泌蛋白のペチドシグナル

2455 ~ 2506 ヘアピン構造、rho-型のターミネーターシグナル

蛋白質PS1のNH<sub>2</sub>部分は、3つの分泌ミコバクテリア抗原85-A、85-Bおよび85-Cにかなり類似している(Closs, O., Harboe, M., Aaelsen-Christensen, N.H., and Magnusson, M. (1980) The antigens of *Mycobacterium bovis*, strain BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis: a reference system Scand J. Immunol. 12: 249-253.) (Vilker, H.G., Harboe, M., Nagai, S., and Bennedsen, J. (1990) Quantitative and qualitative studies on the major extra-cellular antigen of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and *Mycobacterium bovis* BCG. Am Rev Respir Dis 141: 830-838.)。異なるミコバクテリア種類の3つの対応する遺伝子がクローニングされ且つ配列された。即ち、*Mycobacterium bovis* BCG 1173P2および*Mycobacterium tuberculosis*の抗原85-A(Borremans, M., De Wit, L., Volckaert, G., Ooms, J., De Bruyn, J., Huygen, K., Van Vooren, J.-P., Stelaar, M., Verhofstadt, R., and Content, J. (1989) Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 57:

3123-3130.) (De Wit, L., De la Cuvelier, A., Ooms, J., and Content, J. (1990) Nucleotide sequence of the 32 kDa-protein gene (antigen 85A) of *Mycobacterium bovis* BCG. Nucleic Acids Res 18: 3995.)、*Mycobacterium bovis* Tokyo × *Mycobacterium kansaii* および *Mycobacterium leprae*の抗原85-B (Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., and Yamada, T. (1988) Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular a antigen. J. Bacteriol 170: 3847-3854.) (Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., Terasaka, K., and Yamada, T. (1990) Cloning and expression of the gene for the cross-reactive a antigen of *Mycobacterium kansaii*. Infect Immun 58: 550-558.) (De Mendonca Lima, L., Content, J., Van Heuverswyn, H., and Degrave, W. (1991) Nucleotide sequence of the gene coding for the 85-B antigen of *Mycobacterium leprae*. Nucleic Acids Res 19: 5789)、および *Mycobacterium tuberculosis*の抗原85-C (Content, J., De La Cuvelier, A., De Wit, L., Vincent-Levy-Frebault, V., Ooms, J., and De Bruyn, J. (1991) The genes coding for the antigen 85 complexes of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG

are members of a gene family: cloning, sequence determination, and genomic organization of the gene coding for antigen 85-C of *M. tuberculosis*. Infect Immun 59: 3205-3212.) *Corynebacterium glutamicum*の蛋白質SP1は、同じ段落(=1, 1の約33%を有する)および約330個のアミノ酸(+/-5)の長さにわたってこれら6個の蛋白質を有する同様の簇群(=1, 1)の約52%。約330個のアミノ酸のこの長さは、ミコバクテリア抗原の場合、蛋白質の全長に対応する。ちょうどPS1のように、すべてこれらミコバクテリア抗原は、グラム陽性菌バクテリア(約42個アミノ酸、=2, 4)中に見いだされる最も長いシグナル配列に匹敵する長さのシグナル配列を含んでいる。ちょうどPS1のように、*M. bovis*の蛋白質85-Bおよび*M. tuberculosis*の蛋白質85-Cは、大部分のシグナル配列より長い親水性NH<sub>2</sub>領域(5個以上の正に荷電した残基)を有する。すべてこれらシグナル配列の他の重要な特性は、グルタミン酸である*M. tuberculosis*の抗原85-Cを除いて、酸残基、即ちアスパラギン酸の3または5の位置に存在する。酸性荷電残基の存在は、Eucaryoticシグナル配列のNH<sub>2</sub>端部に共通なものであるが、原核シグナル配列のNH<sub>2</sub>端部に対して全く例外的である。(Perlman, D., and Halvorson, H.O. (1983) A putative signal peptide

as a recognition site and sequence in eucaryotic and prokaryotic signal peptides. *J Mol Biol* 167: 391-409. (Watson, M.E.B. (1984) Compilation of published signal sequences. *Nucleic Acids Res.* 12: 5145-5164). この特徴の理由は知られていない。他の重要な類似点は、EMBL/MIPSデーターベンクに存在するPS1と他の蛋白質との間に見いだせない。

実施例5. N末端配列の決定に用いられるPS1及びPS2精製操作

操作1：

タンパク質PS1及びPS2をポリアクリラミドゲルでの調製電気泳動及び電気溶出によりC. グルタミクムATCC17965の培養上液から精製した。

34℃において富LB培地200mlで培養された細胞を4℃で15分間80000gで遠心することにより定常増殖期に収集した。次いで培養上液のタンパク質を6.0%硫酸アンモニウムで沈降させ、4℃で15分間13000gで遠心することにより収集した。ペレットをpH6.8の1.0MトリスHCl緩衝液4mlに溶解し、かかる後溶出液をこの同緩衝液中4℃で24時間透析する。

硫酸アンモニウム沈降後に得られた透析タンパク質抽出液をフォーマット16×20×0.75cmの電気泳動ゲル上に沈着させる。電気泳動は4%濃縮用ゲル及び7.5%分離用ゲルを用いてLaemmli (1970)により記載

る。更に、分離用ゲルを使用する前にブレランする。これらすべての予防処置はタンパク質のN末端を変えて、ひいてはこの末端をブロックする可能性があるラジカルの形成をできるだけ避ける目的で行われる。電気泳動の終了後、タンパク質をPVDF膜上に転写する。この操作はpH8.0の5.0Mトリス、5.0Mホウ酸緩衝液中50V、60分間で行う。次いで膜を位置決定を可能にするアミドブラックで染色し、タンパク質PS1及びPS2に相当するバンドを切出す。次いでそのタンパク質バンドを脱染して、それらをN末端配列決定に用いた [Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4(バクテリオファージT4の頭部のアセンブリーにおける構造タンパク質の開裂). *Nature*, 227:880-885; Lee, C., Levin, A., Branton, D. 1987. Copper staining: a five minute protein stain for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels(銅染色: ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリラミドゲル用の5分間タンパク質染色). *Anal. Biochem.*, 166:308-312]。

実施例6. PS1-と呼ばれるもしくはPS1を合成しないコリネバクテリウム・グルタミクム株の產生(図5)

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(Brevibacterium lactofermentum) 15と称されるC. グルタミクム株(C. glutamicum)は大脳菌K12の改变

特表平6-502548 (10)

された操作に従い行う。泳動は40mAで15時間にわたり行う。次いでゲルをLeeら(1987)により記載された操作に従い塩化銅で染色する。タンパク質PS1及びPS2に相当するタンパク質バンドを切出し、かかる後完全に脱染する。次いでタンパク質を48mA、4℃で5時間かけてゲルから電気溶出し、かかる後pH6.8の1.0MトリスHCl緩衝液で数回透析してから、いくつかのアリコート分画に分け、-20℃で凍結する。精製率は90%以上の純度で25%程度である。

操作2：

タンパク質PS1及びPS2を阻外透過、電気泳動及びPVDF膜上での転写によりC. グルタミクムATCC17965の培養上液から精製する。

34℃において富LB培地で培養された細胞を4℃で15分間80000gで遠心することにより定常増殖期に収集する。上液4mlをpH7.0の5.0Mトリス緩衝液で5.0倍希釈し、かかる後カットオフが3.0kDである阻外透過膜で遠心する。このステップによれば80%タンパク質抽出液を得ることが可能であり、かかる後これを4%濃縮用ゲル及び7.5%分離用ゲルからなる電気泳動ゲルに沈着させる。電気泳動は下記修正を加えてLaemmliにより記載された操作に従い行う。ゲル及び泳動用緩衝液を調製するために用いられるすべての溶被を脱氣させ、これらに0.1Mチオグリコレートを含有させ

DNAに対して許容的であり [Bonnassie, S., Oreglia, J., Trautvetter, A., 及び Sicard, A. M. (1990). Isolation and characterization of a restriction and modification deficient mutant of *Brevibacterium lactofermentum* (ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの制限及び修正欠失変異体の単離及び特徴化). *FERM Microbial Letters*, 72:143-146]、一方C. メラッセコラ(C. melassecola) ATCC17965と称されるC. グルタミクム株は大脳菌のDNAに関して非常に制限的な株である [Reyes, O., Guyonvarch, A., Bonamy, C., Salti, V., David, F., 及び Leblon, C. (1991). Integrator-bearing vectors: a method suitable for stable chromosomal integration in highly restrictive Corynebacteria(「インテグロン」・保持ベクター: 高制限コリネバクテリアにおける安定的染色体組込みに適した方法). *Gene*, 107:61-68]。この理由から、B. ラクトファーメンタム15株をcsp1遺伝子の遮断を実施するために選択した。csp1遺伝子の物理的図はC. メラッセコラATCC17965及びB. ラクトファーメンタム15の場合で同一であることが確かめられた。

カナマイシン耐性(Km<sup>r</sup>)を付与するストレプトコッカス・ファエカリス(*Streptococcus faecalis*)のaphaA3遺伝子を含むプラスミドpAT21の1.5kbp IaI断片 [Trieu-Cuot, P., 及び Courvalin, P. (1983).

Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'-5'-aminoglycoside phosphotransferase type III (3'-5'-アミノグリコシドホスホトランシスウェラーゼタイプIII)についてコードするストレプトコッカス・ファエカリスプラスミド遺伝子のヌクレオチド配列 (Gene, 23: 331-341) をプラスミド pCGL612 中に存在する csp1 遺伝子の独特な KpnI 部位 (Asp718) に挿入して、プラスミド pCGL613'を得た。プラスミド pCGL613'を保有する組換え大腸菌株が実際に PS1-表現型であることは抗 PS1 ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより示された。このプラスミドは C. グルタミクムではなく大腸菌で典型的に複製する。それを電気的形質転換により B. ラクトファーメンタム 15 と称される C. グルタミクムの株に導入し (Bonamy, C., Guyonvarch, A., Reyes, O., David, F. 及び Leblon, G. (1990). Interspecies electro-transformation in Corynebacteria (コリネバクテリアにおける種間電気形質転換) . FEBS Microbial Letters, 66: 263-270) 、 Km' 形質転換株を選択した。Km' 形質転換株において、プラスミド pCGL613' は宿主ゲノムの csp1 領域との相同的組換えにより C. グルタミクムの染色体中に組込まれるとと思われる。形質転換株の 2.2. 5%において二重組換え現象が生じて、形質転換株プラスミドの csp1 :

aphA3 相立体による野生型 csp1 遺伝子の置換を起こし、Km'・Tet' 表現型をえた (図 5)。BglII 又は BamHI 及び EcoRI のいずれかで切断された野生型株と Km'・Tet' 形質転換株の 1 つとの全染色体 DNA を pCGL613' プローブとのサザンブロッティングにより分析した (Sambrook, J., Fritsch, E. F. 及び Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a Laboratory manual (分子クローニング: 実験マニュアル). second edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Publications)。csp1 遺伝子は野生型株で約 7.5 kb 断片に含まれ、一方組込み pCGL613' は csp1 遺伝子中に挿入された 1.5 kb aphA3 遺伝子に相当する約 9 kb 断片を含む。BamHI - EcoRI 切断から図 5 で示された組込みの構造を確認する。

Km'・Tet' 組込み体を抗 PS1 ポリクローナル抗体を用いて PS1 の発生に関するウェスタンブロッティングでも分析した。この株の培養上液又は組型抽出物のいずれにもタンパク質 PS1 はない。これは λgt11 に組込んでクローニングされた csp1 遺伝子が C. グルタミクムで実際に PS1 をコードする独特な遺伝子に相当することを確認させる。

この PS1-C. グルタミクム株は完全に生存可能であり、その増殖速度は影響を受けないようである。この

結果は演繹的にみて生存力に影響を与えることなく C. グルタミクム株への相同的又は異種 DNA の組込み用のターゲットとして csp1 遺伝子領域を使用できることを示す。

実験例 7. マルチコピーで csp1 遺伝子の C. グルタミクム中における発現、その合成及びその分泌に必要な PS1 の重要な領域の分析

この一連の実験のために、プラスミド pCGL616 を構築した。それは全 csp1 遺伝子を含んでおり、プラスミド pCGL125 から構築され、これは C. グルタミクムで複製でき、ストレプトコッカス・ファエカリスの aphA3 遺伝子を含むクローニングカセットを備えたプラスミド pBL1 (Santamaría, R., Cill, J. A., Mesas, J. M. 及び J. F. Martín (1984). Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum* (ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムにおける内在プラスミドの特徴化とクローニングベクター及び形質転換系の開発). J. Gen. Microbiol. 130: 2237-2248) 、及び大腸菌で複製でき、csp1 遺伝子を含むプラスミド pCSP1G に相当する。この組立てから得られるプラスミド pCGL616 (図 6) は C. グルタミクムで複製できる。

C. グルタミクム PS1- 株における PS1 合成の回復

PS1 合成のいわゆる B. ラクトファーメンタム 15 PS1- 株における回復はプラスミド pCGL616 の後者への導入後に観察される。プラスミド pCGL616 を保有するこの B. ラクトファーメンタム 15 PS1- 株において、多量に分泌された PS1 は野生型 B. ラクトファーメンタム 15 株 (天然 PS1+) との比較により検出される。これは csp1 遺伝子のコピー数を増加させることにより C. グルタミクム株で分泌される PS1 の濃度を増加させうることを示す。

この結果はいわゆる C. メラッセコラ ATCC17965 株でも証明される。

端部切取り PS1 タンパク質の合成を可能にする pCGL616 に由来するプラスミドの構造 (図 7)

この実験は天然タンパク質に関する 67000 (M<sub>v</sub>) の代わりに約 23000 (M<sub>v</sub>) に相当する分子量の端部切取り PS1 タンパク質が C. グルタミクムでお分泌されることを示す。

7 種の欠失をプラスミド pCGL616 から出免して csp1 遺伝子領域で行い、7 種の異なるプラスミドを得た。これらすべての欠失は PS1 のシグナル配列に相当する DNA 領域と csp1 遺伝子の転写ターミネーターを保存している。すべての場合において、端部切取り PS1 タンパク質の合成及び分泌を抗 PS1 ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより分析

した。これらの結果は *csp1* 遺伝子のほとんどを欠失しても、端部切取りクンバク質 *PS1* の合成及び分泌をお可能であることを示している(図7)。この結果を許容する最大欠失は *csp1* 遺伝子の約 1.3 kb の *Nco* I - *Bsp* E I (*Bsp* M I I) 断片の欠失に相当するが(*pCGL1041*)、これは分泌成熟形として約 29 kD 及び約 24 kD の *PS1* に関する前駆タンパク質サイズを与える。約 23 kD のタンパク質はこのプラスミド *CGL1041* を保有するいわゆる B. ラクトファーメンタム 15 *PS1* - 株の培養上澄で抗 *PS1* 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより実際に検出される。

実施例8. *csp1* 系に基づき *pCGL1030* と称される C. グルタミクムにおける表現及び分泌ベクターの構造(図8, 9, 10, 11)

プラスミド *pCGL1030* の構造(図8)

C. グルタミクムで複製できるこのプラスミド(C. グルタミクムのプラスミド *pBL1* を含む)は、C. グルタミクムの *csp1* 遺伝子のプロモーターとシグナル配列に成熟 *PS1* 配列の最初の 30 アミノ酸を加えたものに相当するこの遺伝子のDNA領域を保持している。マルチクローニング部位(図8におけるボリリンカ-2)は、C. グルタミクムで発現されることを要するあらゆる非相同的遺伝子と同期して容易にクローニングさせる

ため、成熟 *PS1* 配列の 30 番目のアミノ酸の直後において。結果的に、このプラスミドは分泌に必要な *PS1* の諸要素を備えており、したがって発現及び分泌双方の手段に対応している。

コリネバクテリウム・グルタミクムにおけるクロストリジウム・サーモセルムの *ce1A* 遺伝子の発現及び対応タンパク質の分泌(図9)

エンドグルカナーゼ A 又は *EC*A と称されるエンドグルカナーゼについてコードする C. サーモセルムの *ce1A* 遺伝子(Cornet, P., Millet, J., Beguin, P. 及び J. P. Aubert (1983). Characterization of two cel (cellulose degradation) genes of *Clostridium thermocellum* coding for endoglucanases(エンドグルカナーゼについてコードするクロストリジウム・サーモセルムの 2 つの *ce1* (セルロース分解) 遺伝子の特徴化). Bio/Technology, 1: 589-594) を *Sma* I 部位でベクター *pCGL1030* に組込んでクローニングし、プラスミド *pCGL1031* を得た(図9)。この *ce1A* 遺伝子は、キメラ構造の目的でタンパク質 *EC*A の翻訳開始部位の非常に近くに *Bst* X I 制限部位を人工的に導入したプラスミド *pCGL1008* に由来する(図10, 11 参照)。タンパク質 *EC*A の合成は *CMC* と称されるエンドグルカナーゼ基質カルボキシメチルセルロースを用いたディッシュにおける酵素活性に関する染色試験によ

り容易に検出できる(Cornet, P., Millet, J., Beguin, P. 及び J. P. Aubert (1983). Characterization of two cel (cellulose degradation) genes of *Clostridium thermocellum* coding for endoglucanases. Bio/Technology, 1: 589-594)。この *CMC* 試験を C. グルタミクムにおける C. サーモセルムのタンパク質 *EC*A の合成を確認するために使用する。富培地(LB・ルリアプロス又は *BHI*・脳心筋インキュベーション)・中全細胞又は培養上澄で実施されるディッシュでの活性に関する *CMC* 試験では、双方の場合においてプラスミド *pCGL1031* を保有するプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム 15 と称される C. グルタミクム株のエンドグルカナーゼ活性を表す。より高い活性は LB + フルクトース又は + グルコース培地でみられ、これは *csp1* プロモーターの調節下での *ce1A* の発現へのこれら 2 種の糖の刺激効果を示している。これはザイモグラム(Beguin, P. (1983). Detection of cellulase activity in polyacryl amide gels using Congo red stained agar replicas (コンゴレッド染色寒天レプリカを用いたポリアクリルアミドゲルでのセルラーゼ活性の検出). Anal. Biochem., 131: 333-338) 及び抗 *EC*A ポリクローナル抗体と共に培養上澄について行われるウェスタンブロッティングで確認される。

合成ポリペプチド(AQK)10 の発現及び分泌に関する

*csp1* 系の使用(図10)

10 回反復されるボリペプチドアラニン・グルタミン・リジンに対応する合成遺伝子を化学的に合成し、プラスミド *pCGL1008* の *Bst* X I 部位に組込んでクローニングし、プラスミド *pCGL1017* を得た。プラスミド *pCGL1017* の *Eco* R I 断片を、シグナル配列の *csp1* プロモーター及び *PS1* の最初の 30 アミノ酸の下流(及びリポーター遺伝子 *ce1A* の上流)に位置するプラスミド *pCGL1030* の *Sma* I 部位に組込んでクローニングし、プラスミド *pCGL1032* を得た(図10)。キメラタンパク質 *PS1* - (AQK)10 - *EC*A の検出をディッシュ中での *CMC* 試験、ザイモグラム又はウェスタンブロッティングにより前記されたように行う。

合成ポリペプチド(AQK)10 の発現及び分泌に関する *csp1* 系の使用(図11)

20 回反復されるボリペプチドアラニン・グルタミンに対応する合成遺伝子を化学的に合成し、プラスミド *pCGL1008* の *Bst* X I 部位に組んでクローニングし、プラスミド *pCGL1002* を得た。プラスミド *pCGL1002* の *Eco* R I 断片を、シグナル配列の *csp1* プロモーター及び *PS1* の最初の 30 アミノ酸の下流(及びリポーター遺伝子 *ce1A* の上流)に位置するプラスミド *pCGL1030* の *Sma* I 部位に組込

んでクローニングし、プラスミド pCGL1033を得た(図11)。キメラタンパク質PS1-(AQ)19-EGAの検出をディッシュ中のCMC試験、ダイモグラム又はウェスタンプロッティングにより前記されたように行う。プラスミド pCGL1033中B、ラクトファーメンタムにおけるその配列はコード配列AQの喪失を示した(B、ラクトファーメンタムでクローニング中AQ<sub>20</sub>からAQ<sub>19</sub>への縮代)。

この一連の実験ではcsp1遺伝子のプロモーターがクロストリジウム・サーキュラムの異種ce1A遺伝子とキメラ構成(AQK)10-ce1A及び(AQ)19-ce1AをC、グルタミクム中で発現させることを示す。更に、これらの実験ではPS1の諸要素、この場合ではそのシグナル配列とその後の異種遺伝子の上流に位置する各成熟配列の最初の30アミノ酸、が対応産物を分泌させることを示す。培地の効果とこの培地への糖、この場合ではグルコース又はフルクトース、の添加又は非添加は対応産物の生産に影響を与える。特に、csp1プロモーターの調節下C、グルタミクム中において、EGAK又はキメラタンパク質(AQK)10-EGAもしくは(AQ)19-EGAの産生はBH1培地よりもLB培地で高く、それはLB培地においてグルコース又はフルクトースで高度に刺激される。C、グルタミクムのcsp1プロモーターはC、サーキュラムの天然ce1

LAプロモーターよりも強いことがわかる: 実際に、天然ce1Aプロモーターを含むいわゆるプラスミドpCGL602保有B、ラクトファーメンタム15株は、ce1AがC、グルタミクムのcsp1プロモーターの調節下にある、プラスミド pCGL1031を保有するこの同株よりも実質上小さなエンドグルカナーゼ活性を有する。

pCGL1032又はpCGL1033を含む異なる株の培養上液について行われたウェスタンプロット実験では、いくつかのタンパク質バンドが抗EGAポリクローナル抗体と反応することを示す。これらの異なるバンドはエンドグルカナーゼEGAに特異的であり(コントロールに不存在)、そのタンパク質及びキメラタンパク質の分解産物におそらく相当する。しかしながら、それより高い分子量のバンドも実際には(AQK)10-EGA(ApCGL1032)及び(AQ)19-EGA(pCGL1033)で密集して(HV(AQ)19-EGA>HV(AQK)10-EGA)観察される。

実施例9. コリネバクテリウム・グルタミクムのタンパク質PS2についてコードするcsp2遺伝子のタクレオチド配列(図12、13)

csp2と称されるPS2をコードする遺伝子を含む2702塩基対断片とその上流領域の配列決定を行った。タクレオチド配列は図12に示される(配列番号No.2)。

図13はこの配列決定された領域の制限地図を表す。コンピューター解析を用いて、1532塩基対読取枠が510アミノ酸に対応することを確認した。

シャイン・ダルガルノタイプ配列AAGGACを翻訳開始コドンのすぐ上流で確認した(-12~-17)。

そのタンパク質のN末端においてグラム陽性菌の非常にありふれたシグナル配列が30アミノ酸で存在する。シグナル配列開裂部位の推定アミノ酸配列Ile pro ala phe alaが発見された。コリネバクテリウム・グルタミクムの培養上液から精製されたエドマン分解技術によるタンパク質のアミノ末端配列の決定では、5nolの精製タンパク質を用いたけれども、シグナルが得られなかつた。2つの精製操作を用いたため、タンパク質PS2はPS1と全く同様にインピボでブロッキングされるが、そのブロッキングは用いられた精製技術の結果でないようである。30アミノ酸に関して提案されたシグナル配列は成熟配列の最初のアミノ酸としてグルタミン(31位)を現すが、これはエドマン技術によるタンパク質のアミノ末端配列決定を不可能にするビログルタミン酸に容易に変換される。このタンパク質PS2はその非常に酸性の特性(pI=4.1)、そのシステイン残基欠如及びその非常に低いメチオニン残基含有率のようなタンパク質の特徴を有する [Sleytr,U.B.(1978),Regular arrays of macromolecules on bacterial cell walls:

structure,chemistry,assembly and function(細胞細胞壁における高分子の規則的配列:構造、化学、アセンブリー及び機能).Int.Rev.Cytol.53:1-84] (Sleytr,U.B.及びP.Hessner(1988),Crystalline surface layers on bacteria(細胞壁における結晶表面層).Ann.Rev.Microbiol.39:311-339)。電子顕微鏡分析ではPS2が実際に細胞表面において組織化された六方晶構造で自ら配列できる壁タンパク質であることが確認されている。

②非依存性タイプの推定ターミネーター部位は停止コドンから76タクレオチドでその遺伝子の3'領域においてみられる。

その配列の特徴は下記のとおりである:

562~567:リボソーム結合部位

579~2108:コード配列

579~668:分岐タンパク質のシグナル配列

2188~2233:ヘアピン構造、②非依存性タイプ

の推定転写ターミネーターシグナル

(停止コドンから76タクレオチドに存在)

実施例10. PS2と称されるもしくはPS2を合成しないコリネバクテリウム・グルタミクム株の産生(図14)

csp2遺伝子の遮断は、aphIIIの挿入により不活性化されたcsp2遺伝子のコピーを保持する、コリネバクテリアについての非複型的なベクター、ベクターp

CGL830 (図14) (プラスミドpCGL811により保持されるcsp2の独特なNruI部位にaphIII遺伝子を組込んだクローニング)によりB. ラクトファーメンタム15と称されるC. グルタミクムを行った。PS2シグナルはプラスミドpCGL830を保持した大腸菌T<sub>G</sub>1株に由来する細胞抽出物についての抗PS2ポリクローナル抗体での免疫学的検出により示されなかった。組込まれたクローニングはB. ラクトファーメンタム15株のエレクトロポレーション及びK<sub>m</sub>に関する選択により選択した。これら組込みのうち、選択遺伝子により野生型遺伝子の置換を起こす二重交換現象を示すT<sub>et</sub><sup>+</sup>クローニングを得た。

プローブpCGL8.1.1を用いたK<sub>m</sub> T<sub>et</sub><sup>+</sup>のXbaI及びSacI切断染色体DNAのサンプル分析は野生型株で得られる2.7kbXbaI及び0.7kbSacIの代わりに各々4.2kb及び2.2kbで断片を示すが、これはaphIII遺伝子の存在と選択したサイズ増加を示す。

異なる分画において抗PS2ポリクローナル抗体でのウェスタンブロッティングによるPS2の検出の欠如は、B. ラクトファーメンタムにおけるcsp2遺伝子の選択を確認させる。このPS2-株は完全に生存可能であり、決してその増殖に影響をうけない。csp1遺伝子を保持するC. グルタミクムの染色体の領域と同様

に、csp2遺伝子を保持するこのDNA領域も細菌の増殖に影響を与えることなく外來DNAの組込み用ターゲットとして使用できる。

#### B. ラクトファーメンタム15PS2-株におけるPS2+表現型の回復

全csp2遺伝子とその上流のDNA領域を含む2.3kbSacI-FspI断片をプラスミドpCGL824に組込んでサブクローニングし、B. ラクトファーメンタム15PS2-株に再導入し、PS2+表現型を回復させた。より多量のPS2はその遺伝子がマルチコピーで存在する場合に得られることに留意すべきである。これらの結果はC. グルタミクムのcsp2遺伝子に由来する分泌産物の量がその遺伝子のコピー数に従い改変できることを示す。

クリオフラクチャ (cryofracture)により(前記技術により得られた)株PS2+及びPS2-のサンプルの電子顕微鏡分析は、タンパク質PS2が細胞表面において組成化された六方晶構造で自ら効率的に配列できる堅タンパク質であることを非常に明確に示す。

#### 実施例11. PS1の分泌に関する温度の効果(図15)

指数増殖期(34°C)における細菌を<sup>35</sup>Sメチオニンで1分間かけて標識した。次いでクロラムフェニコール(100μg/ml)及び過剰量の冷メチオニン(<sup>32</sup>S)を加えた(時間0)。次いで細胞懸濁液の温度を望ましい

温度まで速やかに調整し、インキュベートを上記温度で30分間続ける。PS1の移動をSDS-PAGE、オートラジオグラフィーにより調べ、密度計測により定量する(図15)。PS1の移動は明らかに温度に依存している。移動は1.0で以下で起きず、それはこの温度を越えて最大約3.0で逆するまで急速に増加する。移動は脂質の相転移と相關している(図15)。

#### 実施例12. コリキバクテリウム・メラッセコラATCC17965に関する染色体DNAライブライアリーカーの構造及びgdhA遺伝子のクローニング

C. メラッセコラの株ATCC17965の染色体DNAをAusubel,F.M., Brent,R., Kingston,R.E., Moore,D., Seidman,J.G., Smith,J.A., Struh,L.K.(Eds) [(1987) Current protocols in Molecular Biology(分子生物学における現行プロトコール), John Wiley and Sons, New York]により記載された方法に従い得た。制限エンドヌクレアーゼMboI(ベーリンガー(Boehringer))による制御的切断をManiatis,T., Fritsch,E.F., Sambrook,J. [(1982) Molecular cloning: a laboratory manual(分子クローニング: 実験マニュアル), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York]により記載された操作に従いこのDNA 1.0μgで行った。DNA断片をAusubelら(1987)で記載されたようにスクロース勾配でそれらのサイズに従い分離した。サイズ6

~1.5kbの断片をライブライアリーカー用に選択した。

クローニングプラスミドpUN121 [Nilsson,B., Uhlen,M., Josephson,S., Gatenberg,S., Phillipson,L. (1983) An improved positive selection plasmid vector constructed by oligonucleotide mediated mutagenesis (オリゴヌクレオチド媒介変異誘発により組立てられた改良陽性選択プラスミドベクター), Nucleic Acids Res. 11:8019-8030] をDr.B.Bachmannから自由入手できる大腸菌の株CM2929からBirnboim,H.C., Doly,J. [(1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA(組換えプラスミドDNAをスクリーニングするための迅速なアルカリ抽出操作), Nucleic Acids Res. 7:1513-1523] の方法により得た。そのプラスミドを制限ヌクレアーゼBcI(ベーリンガー)で直鎖化した。

ライブライアリーカーはBcIで直鎖化されたプラスミドpUN121 1μg及び前記6~1.5kbDNA断片2μgのAusubelら(1987)により記載された条件下におけるT4DNAリガーゼ(ベーリンガー)での結合により構築した。結合混合物はDover,W.J., Miller,J.F., Ragsdale,C.W. [(1988) High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation(高電圧電気穿孔法による大腸菌の高効率形質転換), Nucleic Acids Res. 16:8121-8145]により記載された操作に従いエレクト

ロボレーションより大腸菌株 D 15 中に導入した。組換えプラスミド保有大腸菌クローニングをテトラサイクリン 10  $\mu$ g/ml 含有 LB 培地上で増殖できるか否かにより直接選択した。全テトラサイクリン耐性クローニングのプラスミドを Birnboim 及び Doly (1979) の方法により得た。これらプラスミドの組合せは DNA ライブライリーに相当する。

グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を欠いた大腸菌株 C L R 2 0 7 r e c A (Hattaj, I. W., McPherson, H. J., Vinton, J. C. (1982). Localization of a strongly conserved section of coding sequence in glutamate dehydrogenase genes (グルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子におけるコード配列の強く保存されたセクションの局在化). FEBS Letters, 147: 21-25) を C. メラッセコラ ATC C 1 7 9 6 5 DNA ライブライリーで形質転換した。アンピシリン 100  $\mu$ g/ml 含有最少選択培地上で増殖できる大腸菌 C L R 2 0 7 r e c A の形質転換クローニングを選択した。このクローニングは組換えプラスミド p C G L 3 1 0 を保持する。Keers, J. L., Tempest, D. W., Brown, C. M. (1970). Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxidoreductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria (グルタミン (アミド): 2-オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼオキシドレダクターゼ (NADP)、一部細菌によるグルタミン酸の合成に関与する酵素). J. Gen. Mi-

crobiol, 64: 187-194) の方法に従い測定されるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性は、プラスミド p C G L 3 1 0 保持大腸菌株 C L R 2 0 7 r e c A で回復される。種々のサブクローニングによって、第一に完全 g d h A 遺伝子を保持する C. メラッセコラの DNA 断片を E c o R I 及び X h o I 制限部位により範囲限定される 3. 8 kb DNA 断片にまで短縮することができた。この E c o R I - X h o I 断片の正確な制限地図は図 16 で表される。次のサブクローニングによって更に正確に g d h A 遺伝子を 2. 2 kb N h e I - B g I I 断片にまで範囲限定することができた。Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis (ゲル電気泳動により分離された DNA 断片の中における特異的配列の検出). J. Mol. Biol., 98: 503-517) の方法による DNA - DNA ハイブリッド形成は、クローニング DNA 断片が実際に C. メラッセコラの株 ATCC 17965 に由来することを示した。

#### g d h A 遺伝子のヌクレオチド配列の決定

前記 E c o R I - X h o I DNA 断片のヌクレオチド配列の決定を実施するため、下記サブクローニングを行った: (1) E c o R I - B a m H I で切断されたベクター M 1 3 m p 1 8 (Norlander, J., Kespe, T., Messing, J. (1983). Construction of improved M13 vectors us-

ing oligodeoxy-nucleotide directed mutagenesis (オリゴデオキシヌクレオチド指向性変異誘発を用いる改良 M 1 3 ベクターの組立て). Nucleic Acids Res., 28: 101-106) への E c o R I - B g I I I, (2) X b a I - P s t I で切断されたベクター M 1 3 m p 1 8 への X b a I - P s t I, (3) S a l I - B a m H I で切断されたベクター M 1 3 m p 1 8 への X h o I - B g I I I, (4) E c o R I - P s t I で切断されたベクター M 1 3 m p 1 9 (Norlanderら, 1983) への E c o R I - P s t I。このため、E c o R I - X h o I 断片に含まれる E c o R I - X b a I 断片の完全ヌクレオチド配列は、Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors (鎖終結阻害剤による DNA 配列決定). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5483-5487 の方法により 2 本鎖で決定できる。g d h A 遺伝子を含む N h e I - B g I I 断片の完全配列は図 17 で表される (配列番号 No 3)。

#### g d h A 遺伝子のヌクレオチド配列の分析

N h e I - B g I I 断片のヌクレオチド配列の分析から下記要素を確認することができる:

a) プロモーター (ヌクレオチド 1 ~ 572)

g d h A 遺伝子のプロモーターはそれが下記構造要素を含むことで特徴付けられる:

・ヌクレオチド 251 ~ 266

σ 60 因子 (Herrick, M. J. (1983). Nitrogen control of the nif regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the ntrC gene and analogies between ntrC and nifA (節炎杆菌における nifA レギュロンの窒素コントロール: ntrC 遺伝子の関与性と ntrC 及び nifA 間の相似性). EMBO J., 2: 39-44) により認識され及びアンモニウムにより調節されるプロモーターに特徴的な配列 TGG(Pu)A(Pu)NNNNTTCCA と類似性を示すシグナル TGTATATCTGTGCGC。

#### -ヌクレオチド 437 ~ 442

ストレプトミセス種のプロモーターの -35 領域に特徴的な配列 TTGAC(Pu) と類似性を示すシグナル TTCACA (Strohl, W. R. (1992). Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomyces promoters (見掛け上のストレプトミセス科のプロモーターに関する DNA 配列の収集及び分析). Nucleic Acids Res., 20: 981-974)

#### ・ヌクレオチド 466 ~ 471

ストレプトミセス種のプロモーターの -10 領域に特徴的な配列 TAC(Pu)(Pu)T と類似性を示すシグナル TAGGAT (Strohl, 1992)

#### ・ヌクレオチド 558 ~ 572

ストレプトミセス種におけるリガソーム結合配列 AAAGCA GGTGATC と類似性を示すシグナル CGGAAACGAGGAAATC (Strohl,

## b) コード配列 (ヌクレオチド 573 ~ 1913)

573 ~ 1913 位にわたる統取枠は下記データからみてグルタミン酸デヒドロゲナーゼのそれに相当する：

・この統取枠から求められたタンパク質は447アミノ酸を含み、予想分子量48957ドルトンである。この分子量はC.メラッセコラの株ATCC17965のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ異型物の変性ゲル電気泳動後に観察されるポリベブチドの場合 (48300D) と非常に近い。

・C.メラッセコラのgdhA遺伝子のヌクレオチド配列から求められたグルタミン酸デヒドロゲナーゼの一次構造は、他の生物由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼの一次構造と強い類似性を有する [Teller,J.K.,Saito,R.J.,McPherson,M.J.,Engel,P.C.,Guest,J.R.(1992). The glutamate dehydrogenase gene of Clostridium symbiosum: cloning by polymerase chain reaction, sequence analysis, and over-expression in Escherichia coli (クロストリジウム・シムボシウムのグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子：ポリメラーゼ鎖反応によるクローニング、配列分析及び大腸菌内過剰発現). Eur. J. Biochem. 206:151-159].

・グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性にとり必須であるとしてBaker,P.J.,Britton,K.L.,Engel,P.C.,Farrant

## 特表平6-502548 (16)

s.G.W.,Lilley,K.S.,Rice,D.W.,Stillman,T.J. ((1992). Subunit assembly and active site location in the structure of glutamate dehydrogenase (グルタミン酸デヒドロゲナーゼの構造におけるサブユニットアセンブリー及び活性部位位置). Proteins. 12:75-88) により述べられたアミノ酸は、C.メラッセコラのグルタミン酸デヒドロゲナーゼ中に存在し、これは Bakerら (1992) により記載された場合に相当する位置である。

・前記一次配列から求められるC.メラッセコラのグルタミン酸デヒドロゲナーゼの二次構造は他の生物のグルタミン酸デヒドロゲナーゼの二次構造と強い類似性を示す (Tellerら, 1992)。

## c) ターミネーター (ヌクレオチド 1937 ~

1977)

gdhA遺伝子のターミネーターはそれが下記構造要素を含むことで特徴付けられる：

ΔG = -13.6 kcal/molでGCペアリングに富むヘアピン構造を形成できる配列CCCTCATCCGCGTTAAGCTAGCCとその後のTに富む配列TTATTTGATTTCTT。このような構造はρ非依存性ターミネーターに特徴的である (Rosenberg,M.,Court,D.(1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription (RNA転写の促進及び終結に関与する調節配列). Ann. Rev. Genet. 10:319-353)。

## C.メラッセコラのgdhA遺伝子の発現の調節

C.メラッセコラATCC17965のgdhA遺伝子の発現の調節はこの株が培養される培地の性質の関数としてグルタミン酸デヒドロゲナーゼ特異活性の変動を測定することにより研究された。グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性は超音波処理で得られたC.メラッセコラの無細胞抽出物から Heersら (1970) の方法により測定した。

この研究に用いられた培地は、ベースが Liebl,V.,Kamer,R.,Schleifer,K.H. ((1989). Requirements of chelating compounds for the growth of Corynebacterium glutamicum in synthetic media (合成培地中コリネバクテリウム・グルタミクムの増殖に関するキレート化合物の要求). Appl. Microbiol. Biotechnol. 32:205-210) により記載されたものである合成培地である。下記改変を加えた：

・炭素源は、最終11g/lでグルコース (培地1、2及び4) であるか又は10g/lでフルクトース (培地3) である。

・NH<sub>4</sub><sup>+</sup>イオンの濃度は培地1、3及び4で1.25 mMである。それは培地2で1.25 mMである (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を制限する)。

・培地4は最終5.0g/lのL-グルタミン酸を含むする。

前記の異なる培地で培養されたC.メラッセコラ株ATCC17965のグルタミン酸デヒドロゲナーゼに関して測定された特異活性は下記表に示される。その活性は形質転換されたNADPH 2 μmol/min/mgタンパク質で表されている。

培地	培地1	培地2	培地3	培地4
gdhA	4.4+/-0.3	23.2+/-1.1	18.2+/-1.8	2.8+/-0.2

この表によってC.メラッセコラATCC17965のgdhA遺伝子の発現調節の下記3タイプを確認することができる。

- ・グルタミン酸による発現の抑制 (倍率1.57)
- ・過剰アンモニウムによる発現の抑制 (倍率5.27)
- ・グルコースによる異化抑制 (フルクトースとグルコースとで倍率4.13)。異化抑制のケースにおいて、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、アコニターゼ及びクエン酸シンターゼ群活性も影響をうけることに留意すべきである。

## gdhA-lacZ融合ベクターの構造

グルタミン酸、過剰アンモニウム及びグルコースによるgdhA遺伝子の調節の転写特性をC.メラッセコラで調節して、これらの調節に付されないC.メラッセコラの変異株を簡単に選択しうる手段を有するために、gdhA遺伝子の翻訳開始用プロモーター及びATGコド

ors: a method suitable for stable chromosomal integration in highly restrictive Corynebacteria ("インテグロン" - 保持ベクター: 高制限コリキバクテリアにおける安定的染色体組込みに適した方法). Gene 107: 61-64) に組込んだクローニング、こうしてプラスミド p CGL 140 を得る (図 18)。

・ g d h A 遺伝子のプロモーターを含む Eco RI - Bsp HI 断片の単離  
・ Bsp HI 末端からプラント末端への変換  
・ Eco RI 及び Sma I で直鎖化されたベクター p MC 1403 (Casadaban, M. J., Chou, J., Cohen, S. M. (1980). In vitro gene fusions that join an enzymatically active  $\beta$ -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: Escherichia coli plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals (酵素活性  $\beta$ -ガラクトシダーゼセグメントを外因性タンパク質のアミノ末端断片に結合させるインビトロ遺伝子融合: 酵酔開始シグナルの検出及びクローニングに関する大腸菌プラスミドベクター). J. Bacteriol. 143: 971-980) に組込まれて得られた断片のクローニングでプラスミド p CGL 133 を得る  
・ 前記 g d h A プロモーター - lac オペロン融合体を含む p CGL 133 の Nhe I - Sal I 断片の単離と Sph I 及び Sal I で直鎖化されたベクター p CGL 241 (Reyes, O., Guyenvarch, A., Bonamy, C., Sallé, V., David, P., Leblon, G. (1991). "Integron" bearing vect

最終 100  $\mu$ g/l まで X-Gal で補充された前記培地 1, 2, 3 及び 4 において p CGL 141 及び p CGL 142 で形質転換された細菌を培養することにより、我々はこれら異なる培地で得られる細菌コロニーが酵素測定で示される調節と適合する着色勾配を有することから g d h A 遺伝子の調節が実際に転写タイプであることを示すことができた。実際には、培地 4 で得られるコロニーは強度増加順に培地 1, 3 及び 2 で得られる場合よりも薄い青色である。我々はこの差異が培地 1 及び培地 4 において p CGL 141 で形質転換された C. メラッセコラの培養物に関する  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の酵素測定レベルで反映されることを示した (グルタミン酸による抑制)。

培地	培地 1	培地 4
$\beta$ -gal特異活性	0.118	0.052
グルタミン酸	1.0	1.0

$\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は C. メラッセコラの無細胞抽出物から Miller, J. H. (1972) (Experiments in molecular genetics (分子遺伝学における実験). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) により記載されたように測定した。

異化抑制で欠失した変異株の選択

C. メラッセコラ ATCC 17965 に由来する株の NTC 变異誘発を実施した。この変異誘発から、第一の選択をグルタミン酸アナログ、4-フルオログルタミン

活性	グルタミン酸 デヒドロゲナーゼ	$\beta$ -ガラク トシダーゼ
コントロール	6.3	10.79
変異株 90	12.1	23.88

したがって得られた結果は、構築された手段で g d h A 遺伝子調節に関する変異株の表現型スクリーニングにより選択できることを実験で示す。単純にカナマイシン選択圧の非存在下で培養することにより、選択後に細胞

から p C G L 1 4 1 及び p C G L 1 4 2 を除去することが非常に容易であることに留意すべきである。

実施例 13. ベプチドのクローニングを可能にするプラスミドの構造

この構造のため、c e l A サブクローニングステップを実施した。プロモーター領域、その遺伝子及びもう1つの未確認遺伝子の開始部分を含む 3.5 kb Hind III 断片の形で利用できる c e l A 遺伝子を、未知遺伝子断片から欠失された 2.6 kb Hind III - Eco RI 断片の形で大腸菌の複製ベクター p M T L 2 3 に組み込んでサブクローニングした (Chambers, S. P., Prior, S. B., Barstov, D. A., 及び Minton, N. P. (1988). The pMTL site-cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing (p M T L - n i c - クローニングベクター, I. タクレオチド配列決定のために音波処理 DNA の使用を容易にする改良 p U C ポリリンカーネル) Gene, 68: 139-148)。

Eco RI 部位をその遺伝子の転写ターミネーターの直後に指向性変異誘発により導入した。この中間サブクローニングは、制限部位が導入されたとすれば、次のクローニングステップに必要である：特に、p M T L 2 3 ポリリンカーネルに組み込むクローニングでは Eco RI 部位直後に N c o I 制限部位を導入できるが、これは N a

e l - N c o I 断片の形で c e l A のコード領域を含む断片を除去することができる。このステップは 3' で未確認配列を欠く c e l A 遺伝子を有することも可能にする。

Hind III - Eco RI 断片の形における c e l A のクローニングを、大腸菌 T C 1 保育株を用いてプラスミド p M T L 2 3 に組込み実施した。このプラスミドを保有する大腸菌株は実際に E G A の発現に関連する CM C + 表現型を保有する；得られた制限断片の分析は予想されたものと一致する。

p P R O K - c e l A の構造 (図 20) は下記のとおりである：

クロントック・ラボラトリーズ社 (Clontech Laboratories, Inc.) (バロアルト, CA, U S A) から入手できる 4.6 kb プラスミド p P R O K - 1 を用いる。

tac プロモーターを含む大腸菌で複製できるこのプラスミド (Brossius, et al. Gene, 27: 151, 1984) を Eco RI - N c o I で加水分解する。

次いでこの制限中に Eco RI プラントの形で図 19 のアダプター D G F 1 / D G F 2 を導入するが、これらのアダプターは B s t X I 部位を形成する。次いで c e l A を前記構造から N a e I (プラント) - N c o I の形で導入する。

こうして得られたプラスミドは p P R O K - c e l A

と称される。それはアダプター D G F 1 / D G F 2 により導入された B s t X I 部位で分離される tac プロモーターの調節下で c e l A 遺伝子を含む。

実施例 14. マルチ A Q 配列の発現を可能にするプラスミドの組立て

20 A la-Gln (A Q) 単位についてコードする配列の挿入を実施するため、D G F 5 / D G F 6 と称される合成オリゴヌクレオチドの第二対を用いたが (図 19)、そのオリゴヌクレオチドは下記合成遺伝子に相当する：

5' C A G E [A Q] 20 C A G G C A 3'  
3' C C G T G T C [A Q] 20 G T 5'

(A Q) は A la-Gln についてコードする配列を表す。

D G F 5 及び D G F 6 配列の末端は B s t X I 部位と適合し、したがってその配列はこの部位でクローニングできる。

D G F 5 及び D G F 6 末端の配列は、一方でそれらがそのクローニング方向に向き、他方でそれらがクローニング後に B s t X I 部位を残すような配列である。

非リシン酸化アダプターの使用によれば直列ないくつかの合成遺伝子の導入をさけることができる。

B s t X I による p P R O K - c e l A (図 20) の切断及び合成遺伝子の結合後に、図 20 で表される構造を有する p P R O K (A Q) 20 c e l A が得られる。

図 21 は A Q / E G A 融合部位の構造を更に詳細に表

し、用いられる B s t X I 部位の重要性を示す。この部位の構造は以下である：

CCATGGCAATGG

それは A T G 開始コドンとアラニンコードコドン G C A 及び決められたコード配列の後にメチオニン挿入用の第二 A T G コドンを含むことが観察できる。

アダプター D G F 5 / D G F 6 の挿入は一方向のみで起き、開心ある対象にとり外來である塩基を導入しない。

このプラスミドを B a m H I で処理し、同様で処理されたプラスミド p C G L 1 2 5 の制限産物との結合により処理する。プラスミド p C G L 1 2 5 (図 22) は複製起源 p B L 1 を含むプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム 1 5 の機能的プラスミドである。

本発明による株はプラスミド (p C G L 1 2 5 - (A Q) 20 - c e l A) (p C G L 1 0 0 2, 図 11) での上記株の形質転換及び形質転換株の選択により得られる。

実施されたすべての融合において、翻訳は (A Q) 20 直前のメチオニンで始まる： (A Q) 20 を C O O H 末端でメチオニンと開接させる予防処置も払われる：タンパク質 c e l A と融合された又はそうでないポリペプチド A Q の検出は融合タンパク質の部分的精製と臭化シアン加水分解又はその逆の後に特異性抗体により又は分析検出により実施できる。反復ベプチドの特異的性質は容易な分離を可能にする。

記載された株は下記起源である:

大腸菌

- CLR207 reck B. バックマン (B. Bachean)
- DHSα ギブコ B R L (Gibco BRL)
- GM2929 B. バックマン
- TCI パスツール研究所 (Institut Pasteur)

ブレビバクテリウム・フラブム

- ATCC 14087 ATCC

コリネバクテリウム・グルタミクム (ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム)

- 15 S. ボナシー (S. Bonassie)
- ATCC 21088 ATCC

コリネバクテリウム・グルタミクム (コリネバクテリウム・メラッセコラ)

- ATCC 17985 ATCC
- DH5α株はグローブンティック・ラボラトリーズ (the glo  
btech laboratories) のカタログ No C 1021-1  
(Palo Alto, CA, USA) から入手できる。  
ATCC株は12301バーコローン・ドライブ, ロ  
ックビル, MD 20852, USA のアメリカン・タイ  
プ・カルチャー・コレクション c/o セールズ・アンド・  
マーケティング部門 (American Type Culture Collect  
ion c/o Sales and Marketing Department) から入手で  
きる。

配列番号: 1

配列の型: ヌクレオチドと対応タンパク質

配列の長さ: 2547 基塩基

鎖の数: 5' - 3' 方向で一本鎖表示された二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: テノム DNA

起源

生物名: コリネバクテリウム・メラッセコラ (Corynebac  
terium melassecola)

株名: ATCC 17965

直展の実験原: クローン pCSPIC

配列の特徴

239-244 TACATA (signal - 3'5') (S)

280-274 TAAGAT (signal - 1'0') (S)

405-415 GAGAAGGAAAAA リボソーム結合部位 (S)

420-2330 コード配列 (S)

420-548 分泌タンパク質ペプチド (S)

2455-2508 ヘアピン構造の依存性ターミネーター

シグナル (S)

関連生物活性: コリネバクテリウム・メラッセコラ及び  
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの細胞外  
タンパク質 P51 の前駆体

ミコバクテリウムの細胞外抗原 85 槍合体のタンパク質  
の前駆体のホモログ

株を1991年7月23日付でパスツール研究所 (パ  
リ) のコレクション・ナショナル・デ・カルチャーズ・  
デ・マイクロオーガニズム (Collection Nationale de  
Cultures de Microorganismes) (C N C M) に寄託した。  
• No 1-1126としてブレビバクテリウム・ラクト  
ファーメンタム 15 [C G L 2005 (B 115)]

AAGCTTCAGGGAAACAAAGGGCTTAAAAGTTATCCACAGATCCAGAGTG	52
ATCCGCCACTGGGTGAAAGTTATCCACAGAAGGGAGGGGGATTGA	104
AAATCAGCGAAATGCCAALAGGTGGAGGGAAATGCTCGGAGTCCTGGCG	156
ATTCGGCGGTGGATTGAAAAAGTCTAAAGTTGAACITAAGATTGAGGTC	208
ATTCGAAAGTTGTACCTGCATCAGAAGGAGTTACATACCCACATATGTAACC	250
TTCGGACTAAAGATCACCGACAGACTGAAAGAGACTGAGAGACTCTAACGGCAT	312
AGCCCACGTGTGTTGTCGGCGGGAGCGGGCAACTTGGGACGGATCTA	364
ACTCATGGGGCTGTGCGAGTATCCAAAATCAAATGAGAAGGAAAC	416
TTCATGCG ACC GCA TTT CGT TCC ATC AAG GCT GAA	455
Met Arg Asp Thr Ala Phe Arg Ser Ile Lys Ala Lys	
GCT CAG GCT AAG CGC CGT TCC CTC TGG ATT GCA GCA GGC	494
Ala Gln Ala Lys Arg Arg Ser Leu Trp Ile Ala Ala Gly	
GCT CGT CCA ACC GCA ATT GCG TGG ACT ATG TCC CTG GCA	533
Ala Val Val Pro Thr Ala Ile Ala Leu Thr Met Ser Leu Ala	
CCT ATG GCT TCG CAG ACC AAC CTT TCC TCT GAT	572
Pro Met Ala Ser Ala Gln Ser Ser Asn Leu Ser Asp	
GCC GTA GTT GGC AGC ATC CGG CAG GGC GTC ACC GAT GGC	611
Ala Val Val Gly Ser Ile Ala Gln Gly Val Thr Asp Gly	
CTG ACT GAC TAC CTG AAG CCT CGC GTC GAA GAG CTT CCT	650
Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Pro Arg Val Glu Glu Leu Pro	
GCT GGT GAA GTC ACC TAC CCA GAG ATC GCC GGG CTG CCT	689
Ala Gly Glu Val Thr Tyr Pro Glu Ile Ala Gly Leu Pro	
GAT GGT GTG CGC GTG ATC AGC GCT GAG TGG GCA ACC TCC	728
Asp Gly Val Arg Val Ile Ser Ala Glu Trp Ala Thr Ser	
AAG CAT GTC ATT TTG ACT ATT CAG TCT GCA GCA ATG CCA	767
Lys His Val Ile Leu Thr Ile Gln Ser Ala Ala Met Pro	
GAG CGC CCA ATC AAG GTG CAG CTG CTG CTT CCG CCT GAC	806
Glu Arg Pro Ile Lys Val Glu Leu Leu Leu Pro Arg Asp	
TGG TAC TCT TCC CCG AAC CGT GAG TTC CCT GAA ATC TGG	845
Tsp Tyr Ser Ser Pro Asp Arg Glu Phe Pro Glu Ile Trp	
GCA CCT GAC GGT CTG CGC GGG ATT GAA GAG CAG AGT GGT	884
Ala Leu Asp Gly Leu Arg Ala Ile Glu Glu Gln Ser Gly	

## 特表平6-502548 (20)

TGG ACC ATT GAG ACC AAC ATT GAG CAG TAC TAC GGC GAT	923	CAG GCG ITG CCT GAC ATC GCT AAC GCT CTT GGC ATG TCC	1586
Tyr Thr Ile Glu Thr Asn Ile Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp		Gln Ala Phe Pro His Ile Ala Asn Ala Leu Gly Met Ser	
AAG AAC GGC ATT GTT GCG CTC CCA ATC GCG GGT GGC GAG Asp	962	ACT GAC GAC CGT GGC GTT GAG TGT GCA CCT GTC GGC GCA	1625
Lys Asn Ala Ile Val Val Leu Pro Ile Gly Glu Ser		Thr Glu Asp Arg Gly Val Glu Cys Ala Phe Val Gly Ala	
TCC TTC TAC IGT GAC TGG GAA GAG CCA AAC AAC GGC AGG	1001	ATC GCT GAC GCT GTT GCC GAC GGC GCG ATG GGC ACC TGC	1664
Ser Phe Tyr Ser Asp Tyr Glu Glu Pro Asn Asn Gly Lys		Ile Ala Asp Ala Val Ala Asp Gly Ala Met Gly Thr Cys	
AAC TAC CAG TGG GAG ACC TTC CTG ACT CAG GAG CTC GCA	1040	CTG ACC AAC GAA TAC GAT GTT ACC GGC GGT AAG GGC CAG	1703
Asn Tyr Gln Tyr Thr Phe Thr Gln Tyr Glu Leu Ala		Leu Thr Asn Asp Val Thr Gly Gly Lys Ala Glu	
CCG ATC CTC GAC AAC GGC TTC CGT TCC AAC ACC GAT CSC	1079	GAC TTC GCT AAC GGT CGC GCA TAC TGG TCT GCA AAC ACT	1742
Pro Ile Leu Asp Lys Gly Phe Arg Ser Asn Thr Asp Arg		Asp Phe Ala Asn Gly Arg Ala Tyr Tyr Ser Ala Asn Thr	
GCC ATC ACC GGT ATC TCC ATG GGC GTT ACC GCT GCG GTT	1118	GGC GCT TTC GGC CTG GTT GGA CGC ATC AAC GCT CGT TAC	1781
Ala Ile Thr Gly Ile Ser Met Gly Thr Ala Ala Val		Gly Ala Phe Gly Leu Gly Arg Ile Asn Ala Arg Tyr	
AAC ATC GCA ACC CAC GAC CCA GAC ATG TTT AAC TTC GTC	1157	TCT GAG CTG GGT GGA CCT GAC TCC TGG TTG GGC TAC CCA	1820
Asn Ile Ala Thr His His Pro Asp Met Phe Lys Phe Val		Ser Glu Leu Gly Gly Pro Asp Ser Tyr Leu Gly Tyr Pro	
GGT TTC TCC TCC GGC TAT CTG GAC ACC ACC TCC GCT GGC	1196	ACC TCT TCT GAG TTG AAG ACA CCA GAC GGA CGT GGC CGC	1859
Gly Ser Ser Gly Tyr Leu Asp Thr Ser Ala Gly		Thr Ser Ser Glu Leu Tyr Thr Phe Asp Gly Arg Gly Arg	
ATG CCA ATC GCT ATT TCC GCA GGC CTG GCA GAC GGC GGC	1235	TTC GTC ACC TTC GAG CAC GGC TCC ATC TAC TGG ACC GCC	1898
Met Pro Ile Ala Ile Ser Ala Ala Leu Ala Asp Ala Gly		Phe Val Thr Phe Glu His Gly Ser Ile Tyr Tyr Thr Ala	
GGA TAC GAT GGC AAC GCA ATG TGG GCA CCA GTC GGT TCT	1274	ACC ACT GGT CCT TGG GAA ATC CCA GGC GAT ATG CTC GCC	1937
Gly Tyr Asp Ala Asn Ala Met Tyr Phe Gly Pro Val Gly Ser		Thr Thr Gly Pro Tyr Ile Phe Asp Met Leu Ala	
GAG CGC TGG CAG GAA AAC GAT CCA AAC AGC AAC GCA GAC	1313	GCA TGG GGC ACC CAG GAC TAT GAG AAG GGC AGC CTC GGC	1976
Glu Arg Tyr Glu Glu Asn Asp Pro Lys Ser Asn Val Asp		Ala Tyr Thr Gln Asp Tyr Glu Lys Gly Ser Leu Gly	
AAG CTC AAC GGC AAG ACC ATC TAC TGT TCC TCT GGT AAC	1352	TAC CCA ACC GGC GCC GCA GTT GAA TAC AAC GGT GGC CTG	2015
Lys Leu Lys Gly Lys Thr Ile Tyr Val Ser Gly Asn		Tyr Pro Thr Gly Ala Ala Val Glu Tyr Asn Gly Gly Leu	
GCT GCA GAT TTC GGT ATG GAA GAC TCT GTC GCT ATT	1391	GCG CAG CAG TTC GAA GGT GGC TAC GTC TAC CGT ACC TCC	2054
Gly Ala Asp Asp Phe Gly Lys Glu Asp Ser Val Ala Ile		Arg Gln Gln Phe Glu Gly Gly Tyr Val Phe Arg Thr Ser	
GCA CCT GCA AAC GCG ACA GTT GTC GGT CTG GAA GTT ATC	1430	ATAT AAC CAG TCT TAC TGG GTT CGC GGA GAA ATC TCC AAG	2093
Gly Pro Ala Asn Ala Thr Gly Val Gly Leu Val Val Ile		Asn Asn Glu Ser Tyr Val Arg Gly Glu Ile Ser Lys	
TCC CTC ATG ACT TCC CAG ACC TTC GTC GAT CGT GCA AAC	1469	AAG TAC GCC GAT GAC GGA ATC TTC GCT CAG CCT GTT GTC	2132
Ser Arg Met Thr Ser Glu Thr Phe Val Asp Arg Ala Asn		Lys Tyr Ala Asp Asp Gly Ile Phe Ala Glu Leu Gly Phe	
CAG GCT GGC GTG GAA GTT GTT GCT ATG TTC CGT CCA TCC	1508	CCA ACC GGC ATG GAG AAG TTG ATC AAC GGT GGC GCT TTC	2171
Gln Ala Gly Val Glu Val Ala Ser Phe Arg Pro Ser		Pro Thr Gly Asn Glu Lys Leu Ile Asn Gly Gly Ala Phe	
GGC GTG CAC TCA TGG GAA TAC TGG CAG TTC GAG ATG ACT	1547	CAG GAA TTC GAA AAG GGC AAC ATC TAC TGG TCC GTG TCC	2210
Gly Val His Ser Tyr Glu Tyr Tyr Glu Phe Glu Met Thr		Gln Glu Phe Glu Lys Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Val Ser	

ACT GGC GCG CAC GTG ATT CTG CAC GGC GAC ATC TTC GAC	1249
Thr Gly Ala His Val Ile Leu His Gly Asp Ile Phe Asp	
GCA TGG GGT GCT AAG GGC TGG GAC CAG GGC GAA TAC GGC	2288
Ala Tyr Gly Ala Lys Gly Tyr Tyr Glu Glu Tyr Gly	
TTC CCA ACC TCT GAC CAG ACC GCA ATC ACC GCG GGT GGA	2327
Phe Pro Ala Thr Ser Asp Glu Thr Ala Ile Thr Ala Gly Gly	
CAG ACC ATT GAT TTC CAG AAC GGC ACC ATC CGT CAG GTC	2366
Gln Thr Ile Asp Phe Glu Asn Gly Thr Ile Arg Glu Val	
AAT GGC CGA ATT GAG GAG TCT CGG TAATAGTGA AGCGCACTTA	2409
Asn Gly Arg Ile Glu Glu Ser Arg	
CGCAACTCTCGCTTCCGGACTTTTGCTGAGCTTGTGCTTGTGGGGGA	2461
GTCACTGTTGAAGGAGATGATTCCTCCCTGGACAGCGGCAGCCCAACAGAAA	2513
GCAGCGCTGGCTCAAGCAGCACCGCAAGGTGAC	2547

配列番号：2

配列の型：ヌクレオチドと対応タンパク質

配列の長さ：2702塩基対

鎖の数：5' - 3' 方向で一本鎖表示された二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノム DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム・メラッセコラ (Corynebacterium selassescota)

株名：A T C C 1 7 9 6 5

直接の実験源：クローラ pCGL815, pCGL824

配列の特徴

582-587 AAGGAGリボソーム結合部位(S)

579-2108 コード配列(S)

579-808 分泌タンパク質シグナルペプチド(S)

2188-2333 ヘアピン構造転写ターミネーターシグナル

(S)

関連生物活性：コリネバクテリウム・メラッセコラ及び  
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの壁の  
外膜表面層を構成するタンパク質と細胞外抗原PS2  
の前駆体

GAAATCCGTGAAATTAGCCGGTTAGTACTTTTCAGGGGTGCTATTCCTAC 52  
 CAGATCGTCAAGTTGTTGGGTAGAGTCACCTGAAATTTAATTCACCGCAGG 104  
 GTGATATATCCTATTTGCTCACTAGTTCCAGGTTAGTGTTATTTAGGTG 156  
 AACAAATTTCAGCTTCGGGTAAGAACACTTCTATGGCCTTCAGAGCTTCTAT 208  
 TAGGAAATCTGACCACTTGTATAATAGCCATCCCCGAAATTGGGGATG 260  
 GGTCAATTGCTGTGAAAGTAGTTTGATGCAATAGACTGCGTTATAA 312  
 AGAAAATGTTAACCTGATCAGATGATATAAAAGAACAGTTGACTCAGGT 364  
 TTGAAGCATTTCTCGATTGCGCTGGCAAAATCTCAATTGTCGCTTACAG 416  
 TTTTCTCAACGACAGGCTGCTAACCTGCTAGTTGCGCTAGTGAGTGG 468  
 CGTTTACTGGATAAAAAGTAATCCATGTCGATCAGGCATTGGGGTGT 520  
 TCCATAGCAATCCAAAGGTTGCTTCGATACCTATTCTCAGGACCTTC 572  
 GCTCT ATG TTT AAC AAC CGT ATC CGC ACT GCA GCT CTT  
 Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu 611  
 GCT GGT GCA ATC GCA ATC TCC ACC GCA GCT TCC GGC GTC  
 Ala Gly Ala Ile Ala Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val 650  
 GTT ATC CCA GCA TTC GCT CAG GAG ACC AAC CCA ACT TTC  
 Ala Ile Pro Ala Phe Ala Gln Glu Thr Asn Pro Thr Phe 689  
 AAC ATC ACC AAC GGC TTC AAC GAT GCT GAT GGA TCC ACC  
 Asn Ile Thr Asn Gly Phe Asn Asp Ala Gly Ser Thr 728  
 ATC CAG CCA GTT GGC CCT GTT AAC CAC ACC GAG GAA ACC  
 Ile Gln Pro Val Gly Pro Val Asn His Thr Glu Glu Thr 767  
 CTC CGC GAC CTG ACT GAC TCC ACC GGC GCT TAC CTG GAA  
 Leu Arg Phe Leu Thr Ser Thr Gly Ile Tyr Leu Glu 806  
 GAG TTC CAG AAC GGC ACC GTT GAG GAA ATC GTT GAA GCA  
 Glu Phe Gln Asn Gly Thr Val Glu Glu Ile Val Glu Ala 845  
 TAC CTG CAG GTT CAG GCT TCC GCA GAC GGA TTC GAT CCT  
 Tyr Leu Ala Val Gln Asn Ser Ala Asp Gly Phe Asp Pro 884  
 TCT GAG CAG GCT GCT TAC GAG GCT TTC GAG GCT GCT CGC  
 Ser Glu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala Phe Glu Ala Ala Arg 923  
 GTC CGT GCA TCC CAG GAG CTC GCA GCT TCC GCT GAG ACC  
 Val Arg Ala Ser Gln Glu Leu Ala Ala Ser Ala Glu Thr 962

CAG CAC TAC TCT GCG CTG ATC CCT AAC CTC TCC ATC GCA 1625  
 Gln His Tyr Ser Ala Leu Ile Pro Asn Leu Phe Ile Ala  
 GCA GTT GCA AAC ATC ACC GAG CTC AAC GCT GCA GAT GCT 1664  
 Ala Val Ala Asn Ile Ser Glu Leu Asn Ala Ala Asp Ala  
 GAA GCA GCA GCT TAC TAC CTC TCC TGG GAC ACC GAC CTC 1703  
 Ala Ala Asn Asn Tyr Leu His Trp Asp Thr Asp Leu  
 GCA ACC AAC GAT GAG GAC GAA GCT TAC TAC AAG GCT AAG 1742  
 Ala Thr Asn Asp Glu Ala Tyr Tyr Lys Ala Lys  
 CTC GAC TTC GCT ATC GAG ACC TAC GCA AAG ATC CTG TTC 1781  
 Leu Asp Phe Ala Ile Leu Thr Tyr Ala Lys Ile Leu Phe  
 AAC GGT GAA GTT TGG CAG GAG CCA CTG GCT TAC GTC CAG 1820  
 Asn Gly Glu Val Trp Gln Glu Pro Leu Ala Tyr Val Glu  
 AAC CTG GAT GCA GGC GCA CGT CAG GAA GCA GCT GAC CGT 1859  
 Asn Leu Asp Ala Gly Ala Arg Gln Glu Ala Ala Asp Arg  
 GAG GCA GCT CGC GCA GCT GAC GAA GCT TAC CGC GCT GAG 1898  
 Glu Ala Ala Arg Ala Ala Asp Glu Ala Tyr Arg Ala Glu  
 CAG CTC CGC ATC GCT CAG GAA GCA GCT GAC GCT CAG AAG 1937  
 Glu Leu Arg Ile Ala Glu Ala Ala Asp Ala Glu Lys  
 GCT ATC GCT CAG GCG CTT GCT AAG GAA GCA GAA GGC AAC 1976  
 Ala Ile Ala Glu Ala Leu Ala Lys Glu Ala Glu Gly Asn  
 AAC GAC AAC TCC TCC GAC AAC ACC GAG ACC GGT TCT TCT 2015  
 Asn Asp Asn Ser Ser Asp Asp Thr Glu Thr Gly Ser Ser  
 GAC ATC GGA TCC TGG GGA CCT TTC GCA GCA ATT GCA GCT 2054  
 Asp Ile Gly Ser Trp Gly Pro Phe Ala Ala Ile Ala  
 ATC ATC GCA GCA ATC GCA GCT ATC TTC CCA TTC CTC TCC 2093  
 Ile Ile Ala Ala Ile Ala Ile Phe Pro Phe Ala Leu Ser  
 GGT ATC GTT AAG TTC TAA TTTCGACCCGAGATAGCTAAAGTAA 2139  
 Gly Ile Val Lys Phe  
 CCACCTCCCTTCTTGGGGAGGTGGTTTCCCTTGGCTAACAGCACCAAA 2191  
 GAAAAGCCACCTCCCTGATCTCAAGGAGGTGGCTTATCTTTTAACTGGG 2243  
 GAGCCGGAGGTTGGCGTCCGATAGCAAAATCTTGGCTTTAAGGGAACGT 2295

GATAATCGGGCTTAATGACTCCTCACTGCGGGAATCCGCAAAGGCATCATG 2347  
 TTTGTTCCAGCGGGTAACTGCGCAGGAGCTTCTCGATCGGGAACTTGGCCCTG 2399  
 GCGGCCACAAATGAAACCAGGGGAGGGATGAAATCCCTGAGGGACGGCGTCG 2451  
 TCAATGATGGTCIGGAACTTCCAAACCCGGGACAGTGAACGCGGCACACCTCGA 2503  
 AGGTAGCTTCCGIGCCAGGGGCGGGGACGGAGACCCGACGGTACCGTT 2555  
 GATCGCCAAAGGAATCGGTGCTTGCCTGGTACCGGCACGGACACCGATGTA 2607  
 TCGAGAGCGAATTGCAACCCATCGCCGGTCACTTCCCTGATTTTCTCCGAG 2659  
 GATCCTCATCCCTGGAGTTGATCGTGTGGGTAGCTCCGAGCTC 2702

配列番号: 3

配列の型: スクレオチドと対応タンパク質

配列の長さ: 2150 基塩基

鎖の数: 5' - 3' 方向で一本鎖表示された二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: デノム DNA

起源

生物名: コリネバクテリウム・メラッセコラ (Corynebacterium melassecola)

株名: ATCC 17965

直接の実験源: クローン pCGL315, pCGL313, pCGL310

配列の特徴

因子60により認識され及びアンモニウムにより調節される251-266 TCGTCATATCTGTCGGプロモーター部位

(S)

437-442 TTCACAプロモーターシグナル領域-35 (S)

466-471 TAGCATプロモーターシグナル領域-10 (S)

558-572 GGAAACCCAGCAAATC リボソーム結合部位 (S)

573-1913 コード配列 (S)

1937-1977 ヘアピン構造の非依存性転写ターミネーター

シグナル (S)

関連生物活性: 48300dポリペプチドとして変性ゲルで泳動するNADPH依存性グルタミン脱ヒドロゲナーゼ活性

CCTAGGCTGGGAGCTCTAGGAGATGTGAAAAACGGGTCAAATTCTCGGA 52  
 TGCAGGCGCTATAAAAGCTGACCAATTCCATTGAGGGTCTCAAGTGTGG 104  
 CCGAGTTATAACCACTAGTCAGTCAGTCTAGGCTCATTCGCTGGCGATCAAA 156  
 TTAAATTAAGAAGAGACTTCATGCAGTTACCGCGCTTTGGCGATACAAA 208  
 TTGATAAAACCTAAAGAAATTTCACAGAAATTAAATTCTTTGTCGTATTC 260  
 TGTGCGACACTGCCATAATTGACGTGAGCAATTACCGCTAAATGCCGC 312  
 AGTGAAGTTAGCTCAAGGAAAGTTGCTTCTAGGGCATCCGTAGTTA 364  
 AAGCTTAAACCGTTAGGTATGACAAGCCGGTTGATGTGAACGCAAGTTTTA 415  
 AAAGTTTCAGGATCAGATTTTCACAGGCAATTGCTCCAGCAAACGCCCTAG 468  
 GATGTACATGGTGGCCCTCAATGGAAACCAACATCACTAAATGGCCAGA 520  
 TACACACTTAAATCGTGGCCCTAGCAGCCAGATGGGAACGAGGAATTC 572  
 ATG ACA GTT GAT GAG CAG GTC TCT AAC TAT TAC GAC ATG 611  
 met thr val asp glu gln val ser asp tyr tyr asp met  
 CTT CTG AAC CGC AAT GCT GGC GAG CCT GAA TTT CAC CAG 650  
 leu leu lys arg asp ala gln pro glu pro his gln  
 GCA GTG GCA GAG GTT TTG GAA TCT TTG AAG ATC GTC CTG 689  
 ala val ala glu val leu glu ser leu lys ile val leu  
 GAA AAG GAC CCT CAT TAC GCT GAT TAC GGT CTC ATC CAG 728  
 glu lys asp pro his tyr ala asp tyr gln leu ile gln  
 CGC CTG TGC GAG CCT GAG CGT CAG CTC ATC TTC CGT GTG 767  
 arg leu cys glu pro glu arg gln leu ile phe arg val  
 CCT TGG TTG GAT GAC CAG GGC CAG GTC CAC GTC AAC CGT 806  
 pro trp val asp asp gln gln val his val asn asn arg  
 GGT TTC CGC GTG CAG TTC AAC TCT GCA CTT GGA CCA TAC 845  
 gly phe arg val gln phe asn ser ala leu gly pro tyr  
 AAG GGC GGC CTG CCT CAC CCA TCT GTC AAC CTG GGC 884  
 lys gln gln arg phe his pro ser val asn leu gln  
 ATT GTG AAG TTC CTG GGC TTT CAG CAG ATC TTT AAA AAC 923  
 ile val lys phe leu gln phe glu gln ile phe lys asn  
 TCC CTA ACC GGC CTG CCA ATC GGT CGT GGC AAC GGT CGA 962  
 ser leu thr gln leu pro ile gln gln lys gln gln

CCT GAC TTC GAC CCT AAG GGC AAG TCC GAT CTG GAA ATC 1001  
 ser asp phe asp pro lys gln ser asp leu glu ile  
 ATG CTC TTC TCC CAG TAC ACC CAG CTG CAC CGC 1040  
 met thr asp cys gln ser phe met thr gln leu his arg  
 CAC ATC GGT GAG TAC CGC GAC GTT CCT GCA GGT GAC ATC 1079  
 his ile gln gln tyr arg asp val pro ala gln asp ile  
 GGA CTT GGT GGC CGC GAG ATC GCT TAC CTG TTT GGC GAC 1118  
 gln gln gln gln arg gln ile gln tyr leu phe gln his  
 TAC CGT CGC ATG AAC CAG CAC GAG TCC GGC GTT TTG 1157  
 tyr arg arg met ala asn gln his gln ser gln ile  
 ACC GGT AAG GGC CTG ACC TGG GTT GGA TCC CTG GTC CGC 1196  
 thg gln lys gln leu trp gln gln ser leu val arg  
 ACC GAG GCA ACT GGC TAC GGC TCC GTT TAC TTC GTG AGT 1235  
 thg gln ala thg gln phe gln val tyr phe val ser  
 GAA ATG ATC AAG GCT AAG GGC GAG AGC ATC AGC GGC CAG 1274  
 gln met ile lys ala lys gln gln ser ile ser gln gln  
 AAG ATC ATC ATC GTT TCC GGT TCC GGC AAC GTC GCA ACC TAC 1313  
 lys ile ile val ser gln gln asn val ala thg tyr  
 GGC ATT GAA AAG GCT CAG CGC TCC GGC AAC AGC GTT ATT 1352  
 ala ile glu lys ala gln gln leu gln ala thg val ile  
 GGT TTC TCC GAT TCC AGC GGT TGG GTT CAT ACC CCT ATT 1391  
 gln phe ser asp ser gln gln trp val his thr pro asn  
 GGC GTT GAC GTG GCT AAG CTC CGC GAA ATC AAG GAA GTT 1430  
 gln val asp val ala lys leu arg gln ile lys gln val  
 CGC CGC GCA CGC GTC TCC GTG TAC GCC GAC GAA GTT GAA 1469  
 arg arg ala arg val ser val tyr ala asp gln val gln  
 GGC GCA ACC TAC CAC ACC GAC GGG TCC ATC TGG GAT CTC 1508  
 gln ala thg his thr asp gln ser ile trp asp leu  
 AAG TGC GAT ATC GCT CTT CCT TGT GCA ACT CAG AAC GAG 1547  
 lys cys asp ile ala leu pro cys ala thg gln asn gln  
 CTC AAC GGT GAG AAC GCT AAG ACT CTT GCA GAC AAC GGC 1586  
 leu asn gln gln asn ala lys thg leu ala asp asn gln  
 TGC CGT TTC GTT GCT GAA GGC GCG AAC ATC CCT TCC ACC 1625  
 cys arg phe val ala gln gln ala asn met pro ser thr

CCA GAG GCT GTT GAG GTC TCC CGT GAG CGC GAC ATC CGC 1664  
 pro gln ala val gln val phe arg gln asp ile arg  
 TTC GGA CCA GGC AAG GCA GCT AAC GCT GGT GGC GTT GCA 1703  
 phe gln pro gln lys ala ala asn ala gln gln val ala  
 ACC TCC GCT CGG GAG ATG CAG AAC GCT TCC CGC GAT 1742  
 thr ser ala leu gln met gln gln ala ser arg asp  
 TCC TGG AGC TTC CAG TAC ACC GAC GAG CGC CTC CAG CGT 1781  
 ser trp ser phe gln cys thr asp gln arg leu gln val  
 ATC ATG AAC AAC ATC TTC AAC AGC TGT GCA GAC ACC GCA 1820  
 ile met lys ala asn ile phe lys thr cys ala gln thr ala  
 GCA GAG TAT GCA CAC GAG AAC GAT TAC GGT GTC GGC GCT 1859  
 ala gln gln arg his gln asn asp tyr val val gln ala  
 AAC ATC GCT GGC TTC AGC AAC GAT GTC GCT GAC GCG ARG CTG 1898  
 asn ile ala gln phe lys val lys val ala asp ala met leu  
 CGA CGC GGC GTC ATC TAA GACCCCTGACTTTAACCCCTGA 1944  
 ala gln gln val ile OCE  
 TCCGGCTAACCATCAGGGATTTTGATTTCTCCAGGTCAATTATCCGATC 1996  
 CACATGGGTTAACATGCGAGCTGTCGGGTGGCGCATATGATGATCACCGTGCTGTCT 2048  
 TAAACGCTGGCCAGAGCTGGGAAAGATCCGGCTTGAATGAGGCCATCTGGT 2100  
 GGCTGGTGGCTTACGCGACATCACTGAGGGGTGGCTGCCAAAGCAGC 2132  
 CGCCAGGCGAGGCCGCTGTGCTGTCGCCCMCATAGGC 2190

## 図面中の符号

図 8 :

A = p : csp1 のプロモーター  
 s : 検定 csp1 シグナル配列  
 m : 成熟 PS 1 の最初の 30 アミノ酸

図 9 :

A = p : csp1 のプロモーター  
 s : 検定 csp1 シグナル配列  
 m : 成熟 PS 1 の最初の 30 アミノ酸

5' から 3' への配列の詳細

ACACGGCATTTGTTCCATCAAGGCTAAAGCTCAGGCTAAGGCCGTTCCC  
 TCTGGATTTCAGCAGGGCTGTCCTCAAGGCTGACTATGTC  
 TGGCACCTATGGCTTCGGCTCAGTCAGCAACCTCTCTGATGCCGAG  
 TTGGCAGCATCCGGCAGGGCTACGGCTGACTGACTGAG  
 CCTCGGAGTGAAGACCTGAGCAGGGCAAGAGGCAAGAAGGCA  
 ACGCCGGAAACACTGAGCAGGGCTGAGCTTAAACAAAATAC  
 CCTCATGGTCTACTCTATTGCGGATAATCAGTCGGAAAGTAAGTCGAATG  
 CTCAGGAGAATGGGAGAGTGGAAAGAGCAAGAGAAATTCTGAAAGGT  
 GCAGGAGGATA

図 1.0 :

A = p : csp1 のプロモーター  
 s : 検定 csp1 シグナル配列  
 m : 成熟 PS 1 の最初の 30 アミノ酸

5' から 3' への配列の詳細

CCTTTCCCTGATGCCGTAGTTGGCAGCATTGCGCAGGGCGTACCGGATGG  
 CCTGACTGACTACCTGAAAGCCTCGCGTCGAAGACCTGCAAGCCAAATTCCAT  
 GGCACAGAAGGCACAGAAGGCACAGAAGGCACAGAAGGCACAGAAGGCAC  
 GAAGGCACAGAAGGCACAGAAGGCACAGAAGGCACAGAAGGCACAGAAGGCAC  
 CCTGTCGACCCGGCAAACACTGTGTCAAGGGCAGGTGTG

図 1.1 :

A = p : csp1 のプロモーター  
 s : 検定 csp1 シグナル配列  
 m : 成熟 PS 1 の最初の 30 アミノ酸

5' から 3' への配列の詳細

CCCTTCCTGATGCCGTAGTTGGCAGCATTGCGCAGGGCGTACCGGATGG  
 CCTGACTGACTACCTGAAAGCCTCGCGTCGAAGACCTGCAAGCCAAATTCCAT  
 GGCACAGGCAAGGGCTCAGGCCAGGGCAGGCCAGGGCCAGGCCAGGG  
 CCAGGCTCAGGCAAGGGCAGGCCAGGGCAGGCCAGGGCAACAGGCTCAGGCCAG  
 GGCTCAGGCTCAGGCCAGGGCAGGCCAGGGCAACACTGTGTCAAGGGT

図 2.2 :

ボリリンカ - 1 : 0.001/SacII, BstXI, NotI, XbaI,  
 ボリリンカ - 2 : 1.521/ClaI, SalI, AatI, KpnI,  
 BglII, XbaI, SstI, PstI, SmaI, BaeHI, SphI,  
 ボリリンカ - 3 : 1.561/XbaI, NotI, SacII, BstXI,

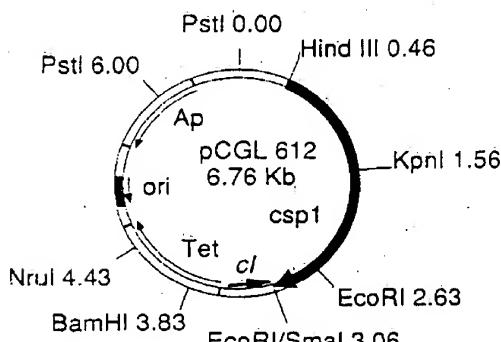


FIG. 1

AAGCTTCAGGGAAACAAAGGCCCTTAAAGTTATCCACAGATCCGAAGTG 52  
 ATCCCGCACTGGGTAAAGTTATCCCAAGAAAGCGCAGGGCGGATTGA 104  
 AAAATCAGCGAAATGGGAAAGGTGGAGCGGAAATGCTGGACTCTGGCG 156  
 ATTCCCGGGCTGGGTGGAAAGAGTCTTAAGTTGAACCTTAAAGTTGAGGT 208  
 ATTCTGAAAGTTGACCTGGCATCAGAGGAGTTACATACCCACATATGTAACC 260  
 TTCTGGACTAAGATCAGGAGACTGAAAGAACTGAAGACTCTCAAGGCAT 312  
 ACCCAACTGGTGTGTTGTCGGGGGGAGGGGGAACTTTCGGGACCGGCTTA 364  
 ACTCATTCGGGGGGCTGGCCGAGTATCCAAAGATCAAATGAGAGGAAAC 416  
 TTC ATG CGC GAC ACC GCA TTT CGT TCC ATC AAG GCT AAA 455  
 Met Arg Asp Thr Ala Phe Arg Ser Ile Lys Ala Lys  
 GCT CAC GCT AAG CGG CGT TCC CTC TGG ATT GCA GCA GGC 494  
 Ala Glu Ala Lys Arg Ser Leu Trp Ile Ala Ala Gly  
 GCT GTC CGA ACC GCA ATT GCG TTG ACT ATG TCC CTG GCA 533  
 Ala Val Pro Thr Ala Ile Ala Leu Thr Met Ser Leu Ala  
 CCT ATG GCT TCG CGT CAG TCC ACC AAC CTT TCC TCT GAT 572  
 Pro Met Ala Ser Ala Glu Ser Ser Asn Leu Ser Ser Asp  
 GCG GTC GTT GGC ACC ATC GCG CGC GGC GTC ACC GAT GGC 611  
 Ala Val Val Gly Ser Ala Glu Gly Val Thr Asp Gly  
 CTG ACT GAC TAC CTG AAG CCT CGC GTC GAA GAG CTT CCT 650  
 Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Pro Arg Val Glu Glu Leu Pro  
 GCT GGT GAA GTC ACC TAC CCA GAG ATC GGC GGG CTG CCT 689  
 Ala Gly Glu Val Thr Tyr Pro Glu Ile Ala Gly Leu Pro  
 GAT GGT CTG CGC GTC ATC ACC GCT GAG TGG GCA ACC TCC 728  
 Asp Gly Val Arg Val Ile Ser Ala Glu Trp Ile Thr Ser  
 AAG CAT GTC ATT TTG ACT ATT CGT TCT GCA GCA AAG CCA 767  
 Lys His Val Ile Leu Thr Ile Glu Ser Ala Ala Met Pro  
 GAG CGC CCA ATC AAG GTG CAG CTG CTC CGG CGT GAC 806  
 Glu Arg Pro Ile Lys Val Glu Leu Leu Pro Arg Asp  
 TGG TAC TCT TCC CGG AAC CGT GAG TTC CCT GAA ATC TGG 845  
 Trp Tyr Ser Ser Pro Asn Arg Glu Phe Pro Glu Ile Trp  
 GCA CTT GAC GGT CTG CGC GGC ATT GAA GAG CAG ACT GGT 884  
 Ala Leu Asp Glu Leu Arg Ala Ile Glu Glu Glu Ser Gly

FIG. 2 (1ere planche)

TGG ACC ATT GAG ACC AAC ATT GAG CAG TAC TAC GCC GAT 923  
 Thr Ile Glu Thr Asn Ile Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp  
 TAG AAC GCC ATT GTG GTG CTC CCA ATC GGT GGC GAG ACC 962  
 Lys Asn Ala Ile Val Val Leu Pro Ile Glu Glu Ser  
 TCC TCC TAC TCT GAC TGG GAA GAG CCA AAC AAC GGC AAC 1001  
 Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Glu Glu Pro Asn Asn Glu Lys  
 AAC TAC CAC TGG GAG ACC TTC CTG ACT CAG GAG CTC GCA 1040  
 Asn Tyr Glu Trp Glu Thr Phe Leu The Glu Glu Leu Ala  
 CGG ATC CTG GAC AAC GGC TTC CGT TCC AAC ACC GAT CGC 1079  
 Pro Ile Leu Asp Lys Glu Phe Arg  
 GCC ATC ACC GGT ATC TCC ATG GGC GGT ACC GCT GGC GTT 1118  
 Ala Ile The Glu Ile Ser Met Glu Glu Thr Ala Ala Val  
 AAC ATC GCA ACC CAC CAC CCA GAC ATG TTT AAG TTC GTC 1157  
 Asn Ile Ala His His Pro Asp Phe Lys Phe Val  
 GGT TCC TTC TCC GGC TAT CTG GAC ACC ACC TCC GCT GGC 1196  
 Glu Ser Phe Ser Glu Tyr Leu Asp Thr Thr Ser Ala Glu  
 ATG CCA ATC GCT ATT TCC GCA GCA GAC GGC GGC 1235  
 Met Pro Ile Ala Ile Ser Ala Leu Ala Asp Ala Glu  
 GGA TAC GAT GCC AAC GCA ATG TGG GGA CCA GTC GGT TCT 1274  
 Glu Tyr Asp Ala Asn Ala Met Trp Glu Glu Val Glu Ser  
 GAG CCC TGG CAG GAA GAT GCA AAC ACC AAC GTC GAC 1313  
 Glu Arg Trp Glu Glu Asn Asp Pro Lys Ser Asn Val Asp  
 AAG CTC AAG GGC AAC ACC ATC TAC GTC TCC TCT GGT AAC 1352  
 Lys Leu Lys Glu Lys Thr Ile Tyr Val Ser Glu Asn  
 GGT GCA GAT GAC TTC GGT AAC GAA GAC TCT GTC GCT ATT 1391  
 Glu Ala Asp Asp Phe Glu Lys Glu Asp Ser Val Ala Ile  
 GGA CCT GCA AAC GCG ACA GGT GTC CCT GAA GTC ATC 1430  
 Glu Pro Ala Asn Ala The Glu Val Glu Val Ile  
 TCC CGT ATG ACT TCC CAG ACC TTC GTC GAT GGT GCA ATC 1469  
 Ser Arg Met The Ser Glu The Val Asp Arg Ala Asn  
 CAG GCT GGC GTC GAA GTC GTT GCT ACC TTC GTC CCA TCC 1508  
 Glu Ala Glu Val Glu Val Ala Ser Phe Arg Pro Ser  
 GGC GTG CAC TCA TGG GAA TAC TGG CAG TTC GAG ATC ACT 1547  
 Glu Val His Ser Trp Glu Tyr Trp Glu Phe Glu Met Thr

FIG.2 (2eme planche)

CAG GCG TTC CCT GAC ATC GCT AAC GCT CTT GCC ATG TCC 1586  
 Glu Ala Phe Pro His Ile Ala Asn Ala Leu Glu Met Ser  
 ACT GAG GAC CGT GGC GGT GAG TGT GCA CCT GTC GGC GCA 1625  
 The Glu Asp Arg Glu Val Glu Cys Ala Pro Val Glu Ala  
 ATC GCT GAC GCT GTC GGC GAC GGC GGC ATG GGC ACC TGC 1664  
 Ile Ala Asp Ala Val Ala Asp Glu Ala Met Glu The Cys  
 CTG ACC AAC GAA TAC GAT GTC ACC GGC GGT ATG GGC CAG 1703  
 Leu The Asn Glu Tyr Asp Val Thr Glu Glu Lys Ala Glu  
 GAC TTC GCT AAC GCT GGC GCA TAC TGG TCT GCA AAC ACT 1742  
 Asp Phe Ala Asn Glu Arg Ala Tyr Trp Ser Ala Asn The  
 GCC CCT TTC GGC CTG GTT GGA CGC ATC AAC GCT CGT TAC 1781  
 Glu Ala Phe Glu Leu Val Glu Arg Ile Asn Ala Arg Tyr  
 TCT GAG CTG GGT GGA CCT GAC TCC TGG TGT GGC TAC CCA 1820  
 Ser Glu Pro Asp Ser Trp Leu Glu Tyr Pro  
 ACC TCT TCT GAC TTG AAG ACA CCA GAC GGA CGT GGC CGC 1859  
 The Ser Ser Glu Leu Lys The Pro Asp Glu Arg Glu Arg  
 TTC GTC ACC TTC GAG CAC GGG TCC ATC TAC TGG ACC GGC 1898  
 Phe Val The Phe Glu His Cys Ser Ile Tyr Trp The Ala  
 ACC ACT GGT CCT TGG GAA ATC CCA GGC GAT ARG CTC GGC 1937  
 The Thr Glu Pro Trp Glu Glu Ile Pro Glu Asp Met Leu Ala  
 GCA TGG GGC ACC CGG GAC GAC TAC TGG GAG AAG GGC ACC CTC GGC 1976  
 Ala Trp Glu The Glu Asp Tyr Glu Lys Glu Ser Leu Glu  
 TAC CCA ACC GGG GGC GCA GTT GAA TAC AAC GGT GGC CTG 2015  
 Tyr Pro Ala Glu Ala Ala Val Glu Tyr Asn Glu Glu Leu  
 CGC CGG CGG TAC GAA GGT GGC TAC GCA TTC CGT ACC TCC 2054  
 Arg Glu Glu Phe Glu Glu Glu Tyr Val Phe Arg Thr Ser  
 AAT AAC CAG TCT TAC TGG CCT GGC GAA AAC ATC TCC AAC 2093  
 Asn Asn Glu Ser Tyr Trp Val Arg Glu Ile Ser Lys  
 AAG TAC GGC GAT GAC GCA ATC TTC GCT CGC CCT GOT TCC 2132  
 Lys Tyr Ala Asp Asp Phe Ile Phe Ala Glu Leu Glu Phe  
 CCA ACC GGC ATT GAG AAC TTG ATC AAC GOT GGC GCT TCC 2171  
 Pro Thr Glu Asn Glu Lys Leu Ile Asn Glu Glu Ala Phe  
 CAG GAA TTC GAA AAG GGC AAC ATC TAC TGG TCC GTG TCC 2210  
 Glu Glu Phe Glu Lys Glu Asn Ile Tyr Trp Ser Val Ser

FIG.2 (3eme planche)

ACT GGC GCG CAC GTG ATT CTG GAC GGC GAC ATC TTC GAC 2249  
 The Glu Ala His Val Ile Leu His Glu Asp Ile Phe Asp  
 GCA TCC CGT GCT AAC GGC TGG GAC CAG GGC GAA TAC GGC 2288  
 Ala Trp Glu Ala Lys Glu Trp Glu Glu Glu Tyr Glu  
 TTC CCA ACC TCT GAC CAG ACC GCA ATC ACC GCG GOT GCA 2327  
 Phe Pro The Ser Asp Glu The Ala Ile The Ala Glu Glu  
 CAG ACC ATT GAT TTC CAG AAC GGC ACC ATC GGT CAG GTC 2366  
 Glu Thr Ile Asp Phe Glu Asn Glu The Ile Arg Glu Val  
 AAT GGC CGA ATT GAG GAG TCT CGG TAATAGTGA AGCGCATCTA 2409  
 Asn Glu Arg Ile Glu Glu Ser Arg  
 CGCAACTCTCGCTTCCGGATTTGTGCCCTGGCTGCTGTGGGGGA 2461  
 GTGCACTGTTGAAGGAGATGATCTCCCTCGACAGCGGCGAGCCCCAACAGAAA 2513  
 GCAGCGCTGGGTCAAGCAGCACCGCAAGGTCGAC

2547

FIG.2 (4eme planche)

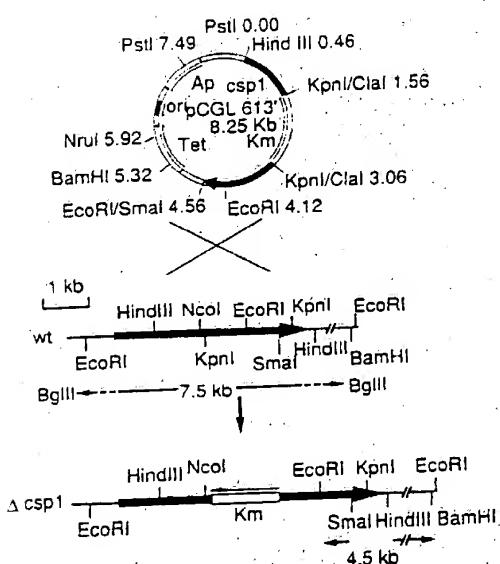
250 Nde I	766 Pvu II	1195 Sph I	2175 EcoRI
194 Alu II	639 Xba I	1104 Kpn I	2037 SnaB I
20 EcoO109 I	518 Th1111	1096 Nco I	1966 Nar I
11 HindIII	381 Fsp I	754 Pst I	1956 Bbv I
		1104 Asp718	2423 BspM II

CSP1 (HS41) KIRIN NISSA

FIG.3

PSI	75	ELPATE VITI TAGLUGDUTUVISA ENAISAVITI OSAMBERIKVQVPROD
	86.8	1.7 VQAANAHUARUQVLAQJAMATNERSQOLVETUQVLSAM GRISKIVQV
	85.8	1.7 ICHANVYQVLEQVQVLSAM GRISKIVQV
	85.8	1.5 UQGNAHUSIISLQGANTNERSQOLVETUQVLSAM GRISKIVQV
	85.5	2.3 TIPQVAVIYQVQVLSAM GRISKIVQV
	85.4	1.7 PUVQDVEVUQVLSAM GRISKIVQV
	85.4	1.6 RRLVQVGRARUQVLSAM GRISKIVQV
PSI	130	LSFHRPQVLSAM GRISKIVQV
	95.8	6.6 FEDQCCSPEVLLUDGRDQVLSAM GRISKIVQV
	95.8	6.6 FEDQCCSPEVLLUDGRDQVLSAM GRISKIVQV
	95.8	6.4 FEDQGNGEAVVLLUDGRDQVLSAM GRISKIVQV
	95.8	7.2 FEDQGNGEAVVLLUDGRDQVLSAM GRISKIVQV
	95.4	6.9 FEDQCCSPEVLLUDGRDQVLSAM GRISKIVQV
	95.4	6.8 FEDQCCSPEVLLUDGRDQVLSAM GRISKIVQV
PSI	185	SDFPFTVQVLSAM GRISKIVQV
	95.8	1.20 SDPMSPAQCGCTVQVLSAM GRISKIVQV
	95.8	1.20 SDMSPACQCGCTVQVLSAM GRISKIVQV
	95.8	1.18 SDMSPACQCGCTVQVLSAM GRISKIVQV
	95.8	1.24 TDPMQUSQNGCCTVQVLSAM GRISKIVQV
	95.8	1.24 TDPMQUSQNGCCTVQVLSAM GRISKIVQV
	95.8	1.22 SDMSPACQCGCTVQVLSAM GRISKIVQV
	95.8	1.22 SDMSPACQCGCTVQVLSAM GRISKIVQV

FIG. 4-A



**FIG. 5**

1

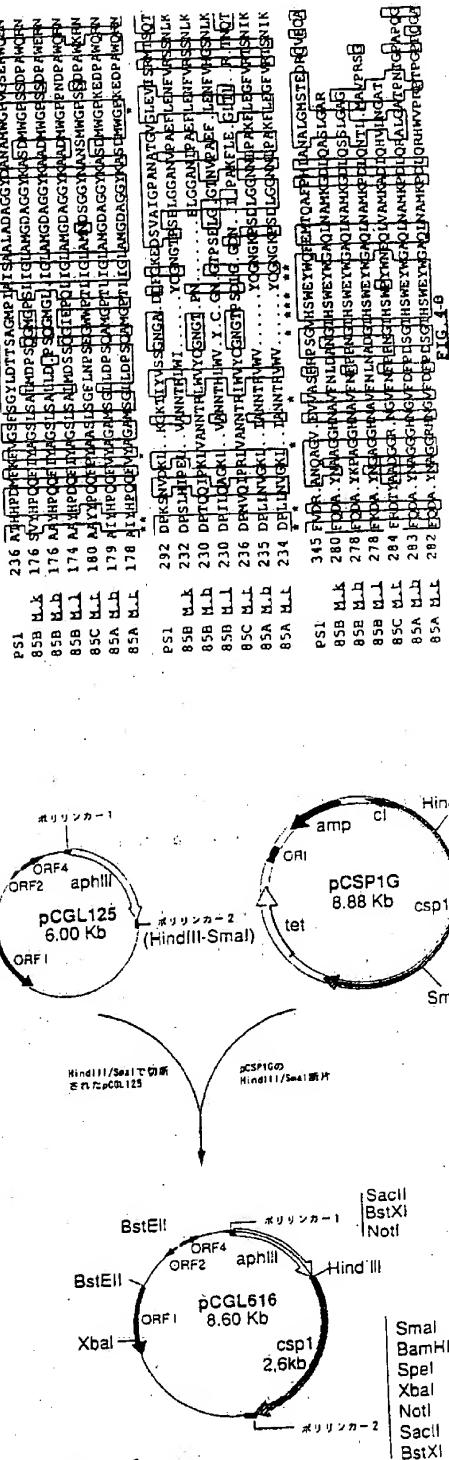


Fig. 6

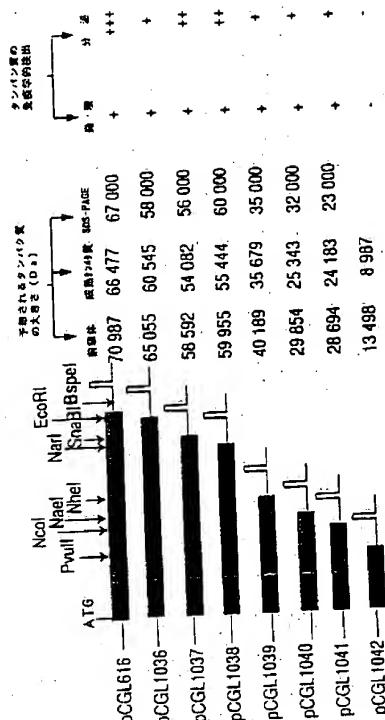


Fig. 7

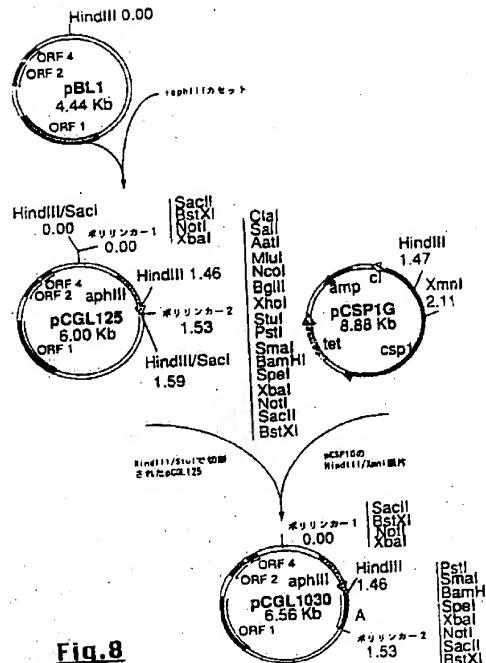


Fig. 8

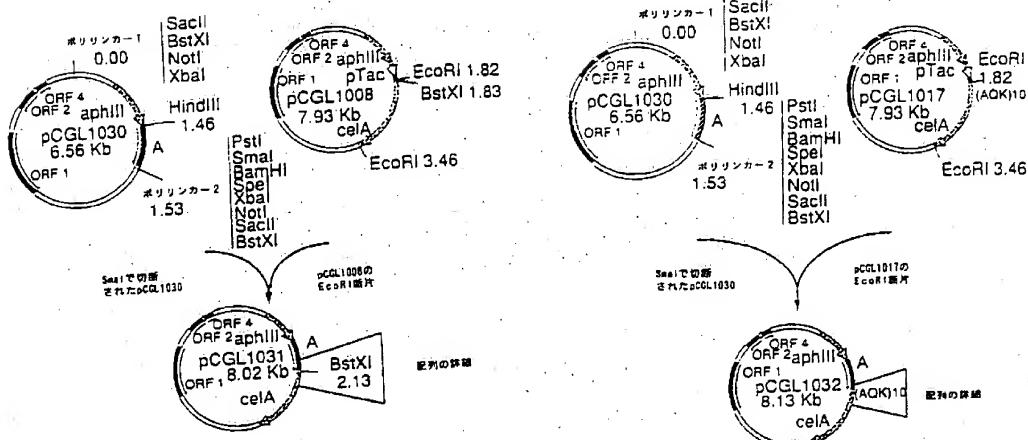


Fig. 9

Fig. 10

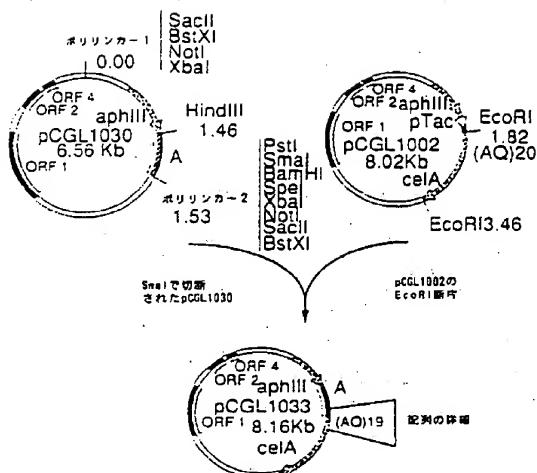


FIG. 11

GAATTCTGTGAAATAGCCGGTTAGTACTTTTCAAGGGGTGTCATTCTTAC 52  
 CAGATCTCAAGTGTGGGTAGAGTCACCTGAAATTAAATTGCAACCGACCG 104  
 GTGATATATGTTATTGCTCAAGTAGTAGTTCGAGGTTAAGTGTATTTAGTG 156  
 AACAAATTCAAGCTCGGGTAGAGACCTTCTATGCGCTTCAGAGCTTCTAT 208  
 TAGGAAATCTGACACCACTTGATTAAATAGCCYACCCCGAATTGGGGATG 260  
 CGCTATTTTGTGAGAGCTAGTTTGTGATGATAGACCTGGCTTATAA 312  
 AGAAATGAAACGTCATGATGATATAAAAGAAACAGTTGACTTCAGGT 364  
 TTGAAGCATTTCTCGGCTGGCAGAAATCTCAATTGTCGCTTACAG 416  
 TTTTCTCAACGACAGGCTGAAAGCTGCTAGTTGCGCTAGYAGTGG 468  
 CGTTTGTGATAAAAGTAAATCCCATGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTC 520  
 TTCCATAGCAATCAGGTTGCTGCTTCGATACCTTATTCAGGAGCCTTC 572  
 GCCTCTATGTTAACACCGTATGCACTTGTGATGATAGACCTGGCTTATAA 611  
 Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu 650  
 GCTGTTGCAATCAGCAATCAGGCTTGTGATGATAGACCTGGCTTATAA 650  
 Ala Gly Ile Ala Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val 689  
 GCTATCAGCAATCAGCAATCAGGCTTGTGATGATAGACCTGGCTTATAA 689  
 AACATCACCAGCCATTTCAGGATGCTGATGATGATGATGATGATGATGATG 728  
 AAC Ile Thr Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly Ser Thr 767  
 ATCGAGCCAATCAGGCTTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG 767  
 Ala Gly Pro Val Ala Phe Asn His Thr Glu Glu Thr 806  
 CTCGCCGACCTGACTGACCTGACCTGGCTGATGATGATGATGATGATGATG 806  
 Leu Arg Asp Leu Thr Asp Ser Thr Gly Ile Tyr Leu Glu 845  
 GAGTTTCAAGAACACCCTTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATG 845  
 GAG Phe Glu Asn Gly The Val Glu Glu Ile Val Glu Ala 884  
 TACCTGAGGCTTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG 884  
 Tyr Leu Glu Ala Ser Ala Asp Gly Phe Asp Pro 923  
 TCTGAGGAGGCTTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG 923  
 Ser Glu Glu Ala Asp Tyr Glu Ala Phe Glu Ala Ala Arg 962  
 GTCCTGCACTGAGGCTTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG 962

FIG. 12 (1ere planche)

ATC ACC AAG ACC CGC GAG TCC GTT GCT TAC GCA CTC AAG 1001  
 Ile Thr Lys Thr Arg Glu Ser Val Ala Tyr Ala Leu Lys  
 GTT GAC CAG GAA GCT ACC GCT GCT TTC GAG GCA TAC CGC 1040  
 Val Asp Gin Glu Ala Phe Glu Ala Tyr Arg  
 AAC GCA CTT CGC GAT GCA GCT ATC TCT ATC AAC CCA GAT 1079  
 Asn Ala Leu Arg Asp Ala Ile Ser Ile Asn Pro Asp  
 GGC TCT ATC AAC CCA GAT ACC TCT ATC AAC CTA CTG ATC 1118  
 Gly Ser Ile Asn Pro Asp The Ser Ile Asn Leu Ile  
 GAT GCT GCT AAC GCT GCT AAC CGC ACC GAT GCT GCA GAG 1157  
 Asp Ala Ala Asn Ala Asn Arg Thr Asp Arg Ala Glu  
 ATC GAG GAT TAC GCT CAC CTT TAC ACC CAG ACC GAT ATT 1196  
 Ile Glu Asp Tyr Ala His Leu Tyr The Glu The Asp Ile  
 GCT CTT GAA ACT CCA CAG CTT GCA TAC GCT TTC CAG GAC 1235  
 Ala Leu Glu Thr Pro Gin Leu Ala Tyr Ala Phe Glu Asp  
 CTG AAG GCT CTT CAG GCT GAG GTC GAC GCA GAC TTC GAG 1274  
 Leu Lys Ala Leu Glu Ala Val Asp Ala Asp Phe Glu  
 TGG TTG GGC GAG TTC GCA ATC GAC GAC GAC GGT AAC 1313  
 Trp Leu Glu Glu Phe Gly Ile Asp Glu Glu Asp Gly Asn  
 IAC GTT CAG CGC TAC CAC CCTT CCT GCT GTA GAG GCA CTC 1352  
 Tyr Val Glu Arg Tyr His Leu Pro Asp Ala Leu Ala Glu  
 AAG GCT GAG GTC GAC GCT CGC GTC GCA GCA ATT GAG CCA 1391  
 Lys Ala Glu Val Asp Ala Arg Val Ala Ile Glu Pro  
 CTT CGT GCA GAC TCC ATC GCT AAC AAC CTT GAG GGG CAG 1430  
 Leu Arg Ala Asp Ser Ile Ala Lys Asn Leu Glu Ala Glu  
 AAG TCT GAC GTT CTG GTT CGC CAG CTC TTC CTC GAG CGT 1469  
 Lys Ser Asp Val Leu Val Arg Glu Leu Phe Leu Glu Arg  
 GCA ACC GCA CGC GAC ACC CTC CGT GTT GTA GAG GGG 1508  
 Ala Thr Ala Glu Arg Asp Thr Leu Arg Val Val Glu Ala  
 ATC TTC TCT ACC TCT GCT CGT TAC GTT GAA CTC TAC GAG 1547  
 Ile Phe Ser Thr Ser Ala Arg Tyr Val Glu Leu Tyr Glu  
 AAC GTC GAG AAC GTT AAC GTT GAG AAC AAG ACC CTT CGC 1586  
 Asn Val Glu Asn Val Asn Val Glu Asn Lys Thr Leu Arg

FIG. 12 (2eme planche)

CAG CAC TAC TCT GCG CTG ATC CCT AAC CTC TTC ATC GCA 1625  
 Glu His Tyr Ser Ala Leu Ile Pro Asn Leu Phe Ile Ala  
 GCA GTT GCA AAC ATC AGC GAG CTC AAC GCT GCA GAT GCT 1664  
 Ala Val Ala Asn Ile Ser Glu Leu Asn Ala Ala Asp Ala  
 GAA GCA GCA GCT TAC TAC CTC CAC TGG GAC ACC GAC CTC 1703  
 Glu Ala Ala Ala Tyr Tyr Leu Ile Trp Asp Thr Asp Leu  
 GCA ACC AAC GAT GAG GAC GAA GCT TAC TAC AAC GCT AAC 1742  
 Ala Thr Asn Asp Glu Asp Glu Ala Tyr Tyr Ala Lys  
 CTC GAC TTC GCT ATC GAG ACC TAC GCA AAG ATC CTG TTC 1781  
 Leu Asp Phe Ala Ile Glu Thr Tyr Ala Lys Ile Leu Phe  
 AAC GGT GAA GTT TGG CAG GAC CCA CTG GCT TAC GTC CAG 1820  
 Asn Glu Glu Val Trp Glu Glu Pro Leu Ala Tyr Val Glu  
 AAC CTG GAT GCA CGC GCA CGT CAG GAA GCA GCT GAC CGT 1859  
 Asn Leu Asp Ala Glu Ala Arg Glu Glu Ala Asp Asp Arg  
 GAG GCA GCT CGC GCA GCT GAC GAA GCT TAC CGC GCT GAG 1898  
 Glu Ala Ala Arg Ala Ile Asp Glu Ala Tyr Arg Ala Glu  
 CAG CGC CGC ATC GCT CAG GAA GCA GCT GAC GCT CAG AAC 1937  
 Glu Leu Arg Ile Ala Glu Ala Ile Asp Ala Glu Lys  
 GCT ATC GCT GAG GGG CCTT GCT AAC GAA GCA GAA GGC AAC 1976  
 Ala Ile Ala Glu Ala Leu Ala Lys Glu Ala Glu Gly Asn  
 AAC GAC AAC TCC TCC GAC AAC ACC GAG ACC GGT TCT TCT 2015  
 Asn Asp Asn Ser Ser Asp Asn Thr Glu Thr Gly Ser Ser  
 GAC ATC GCA TCC TGG GGA CCT TTC GCA GCA ATT GCA GCT 2054  
 Asp Ile Glu Ser Trp Glu Phe Ala Ala Ile Ala Ala  
 ATC GCA GCA ATC GCA GCT ATC TTC GCA TTC CTC TCC 2093  
 Ile Ile Ala Ala Ile Ile Ile Phe Pro Phe Leu Ser  
 GGT ATC GTT AAC TTC TAA TTTCGAGGAGATAGCTAAAGTTAAA 2139  
 Gly Ile Val Lys Phe  
 CCACCTCCCTTCTTCTGGGGAGGGTTTTTCTCTGGCTAACGGCACCAAA 2191  
 GAAAAAGCCACCTCCCTGATCTCAAGGAGGCTGGCTTATCTTTTACTGGG 2243  
 GAGCCGGAGGGTTGGGCTGATAAGCAGGAAAGTCTTTGCTTTAACGGAAACGT 2295

FIG. 12 (3eme planche)

GATAATCGGCTTAATGACTCCCACTGGGGAAATCCGCAAAGGCATCATG 2347  
 TTGTTCCAGGGTAAGTGCGCACCGAGCTTCGATCGGGACTTGCCTG 2399  
 CGCCACAAATGARCCAGGGGAGGGATGAAATCCGTAGGGACGGGTGCCC 2451  
 TCAATGATGGCTGAAACTTCCAAACCAAGGACCCAGTGACCGCCCAACCTCGA 2503  
 AGTAGGCTTCGTCAGGGCAGGGCCGGCACGGAGACCGACGGTACCGTT 2555  
 GATGCCRAAGGAATCGGCTGCTTGCTGACGGCCACGACCCAGTTGA 2607  
 TCGAGGGAAATGACACCATCGCCGGTCAAGTTCTTGTATTTCTCCGCAG 2659  
 GATCCATCCTGGAGTTGATCGTGEGGTAGCTCCGAGCTC 2702

FIG. 12 (4eme planche)

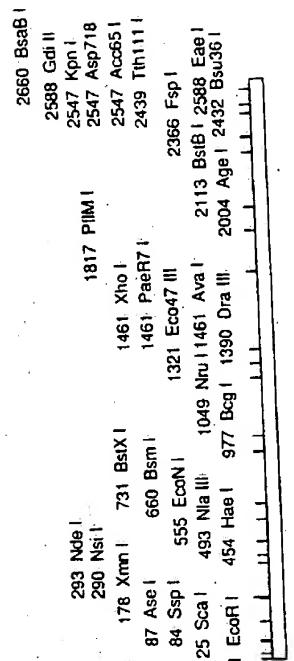
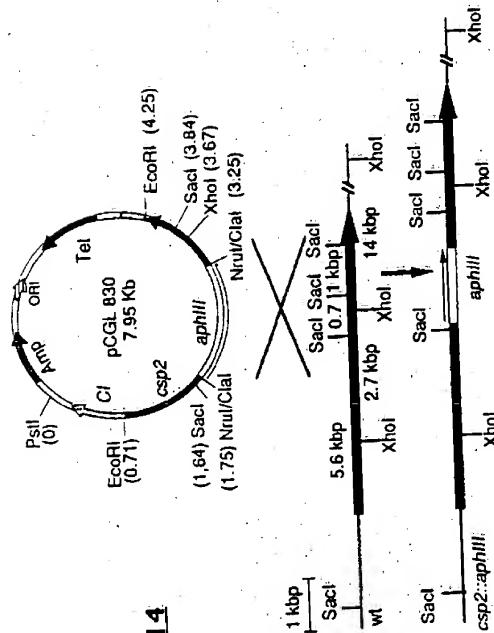


FIG. 13

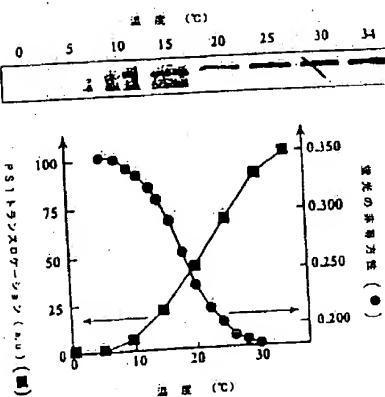


FIG. 15

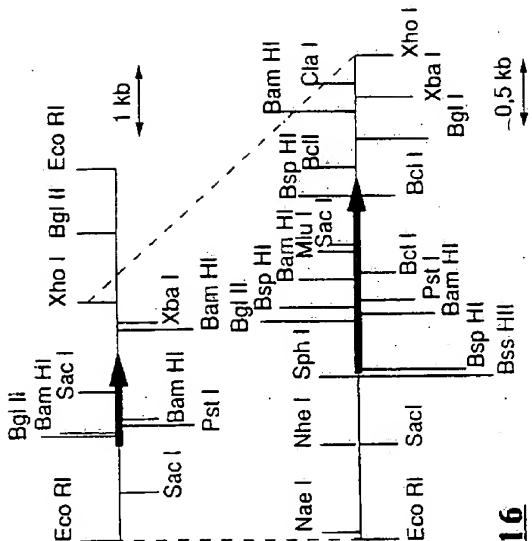


FIG. 16

OCTAGCCCTGGGAGCTCTAGGAGATTGTGAAAAACGGGTCAAATTCTCCGA 52  
 TGCAAGCCCTATAAAAGCTCCTACCAATTCCATTCAGGGTGCCTCAAGTGTGG 104  
 CCAGGTTATATAACCAAGTCACTGCTACCTGGCTGGATGAAT 156  
 TTAATTAAAGAAGAGACTTCATGCAGTTACCCGCCGTTTGGCAAGACCAA 208  
 TGTGAAACCTAAAGAATTTTCAAAACAATTTCATTCTGGTGTATCATAC 260  
 TGTGCGACACTGCCTATAATGGACCTGAGCATTTACAGCCTAAATGCGCGC 312  
 AGTGAGTTAAGTCTAAAGCAAGAATTGCTTGTGGCAGTCAGTTA 364  
 AAACCTTAAACCTTAAAGCTTAAAGCAAGCGGTTGTGATGAAACCGCAGTTTTA 416  
 AAAGTTTCAAGCATCAGATTTCACAGGCTTTGCTCCAGCAAACCGCTAG 468  
 GATGACATCTGGTCCCTCAATGGGACCCACATCACTAAATGGCCAGA 520  
 TACACACTTAAATCGTGCOCGATGCAGCCGACATGGGAAACGGGAAATC 572  
 ATG ACA GTT GAT GAG CAG GTC TCT AAC TAT TAC GAC ATG 611  
 met val asp pro lys ser asp asn tyr eye asp met  
 CTT CTG AMG CGC AAT CCT GCG GAG CCT GAA TTT CAC CAG 650  
 leu leu lys arg asn ala gly glu pro glu phe his gln  
 GCA GTC GAG GAG GTT TTG GAA TCT TTG AAC ATC GTC CTG 689  
 ala val ala glu val glu ser leu lys ile val leu  
 GAA AMG GAC CCT CAT TAC GCT GAT TAC GGT CTC ATC CAG 728  
 glu asp pro his tyr ala asp tyr gly leu ile gln  
 CGC CTG TCC GAG CCT GAG CGT CAG CTC ATC TTT CCT GTC 767  
 arg leu cys glu pro glu arg gln leu ile phe arg val  
 CCT TGG CCT CAT GAC CAG CGC CAG CTC CAC GTC AAC CCT 806  
 pro trp val asp arg gln gln val his val asn arg  
 GGT TTC CGC CTG CAG TCC AAC TCT CCA CCT GCA CCA TAC 845  
 gly phe arg val gln phe asn ser ala leu gly pro tyr  
 AAC GGC GGC CGC CTG CAC CCT CCT GTC AAC ATC CTG GGC 884  
 lys gly leu arg his pro ser val asp leu gly  
 ATT GTG AMG TTC CTG CGC TTT GAG CAG ATC TTT AAA AAC 923  
 ile val lys phe leu gln phe glu gln ile phe lys asn  
 TCC CTA ACC GGC CTG CCA ATC GGT GGT GGC AAG GGT GGA 962  
 ser leu thr gly leu pro ile gln gln gln lys gln gln

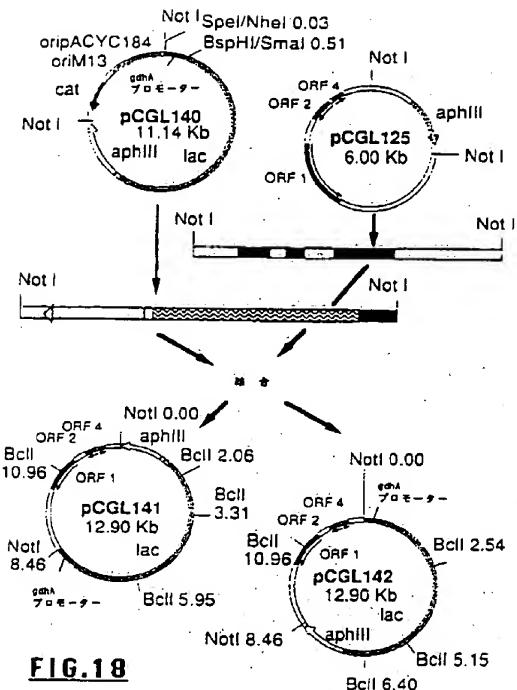
FIG. 17 (1ere planche)

TCC GAC TTC GAC CCT AAG GGC AAG TCC GAT CTC GAA ATC 1001  
 ser asp phe asp pro lys gln lys ser asp leu glu ile  
 ATG CTC TTC TCC CAG TCC TTC ATG ACC GAC CTC GAC CGG 1040  
 met arg phe cys gln ser phe met thr glu leu his arg  
 CAC ATC GGT GAG TAC CGC GAC GGT CCT GCA GGT GAC ATC 1079  
 his ile gln glu tyr arg asp val pro ala gln asp ile  
 GGA GTT GGT GGC CGC GAG ATC GGT TAC CTC TTT GGC CAC 1118  
 gln val gln gln arg glu ile gln tyr leu phe gln his  
 TAC CCT GGT GGC AAC CAC GAC GAG TCC GGT GTC 1157  
 tyr arg arg met ala asp gln his gln ser gln val leu  
 ACC GGT AAC GGC CTG ACC TGG GGT GGA TCC CTG GTC CGC 1196  
 thr gln lys leu the trp gln gln ser leu val arg  
 ACC GAG GCA ACT GGC TAC GGC TGC GTT TAC TTC GTC ACT 1235  
 thr glu ala the gln tyr gln cys val tyr phe val asp  
 GAA ATG ATC ATC AAG GCT AAG GGC GAG AGC ATC ACC GGC CAG 1274  
 glu met ile lys ala lys gln glu ser ile ser gln gln  
 AAC ATC ATC GTC GTT TCC GGT TCC GGC AAC GTC GCA ACC TAC 1313  
 lys ile ile val ser gln ser gln gln val ala the tyr  
 GCG ATT GAA AMG GCT CAG GAA CTC GGC GCA ACC GTT ATT 1352  
 ala ile gln ala gln glu leu gln ala the val ile  
 GCT TTC TCC GAT TCC AGC GGT TGG GTT CAT ACC CCT ATT 1391  
 gln phe ser asp ser ser gln trp val his thr pro asp  
 GGC GTC GAC GTC GAG CTC CGC GAA ATC AAG GAA GTT 1430  
 gln val asp val ala lys leu arg glu ile lys glu val  
 CCC CCC CCA CCC GTC TGC TAC GGC GAC GAC GTT GAA 1469  
 arg arg ala arg val ser ser tyr ala asp gln val glu  
 CCC GCA ACC TAC CAC ACC GAC GGG TCC ATC TGG GAT CTC 1508  
 gln ala the tyr his the asp gln ser ile trp asp leu  
 AAG TGC GAT ATC GCT CCT CCT TGT GCA ACT CAG AAC GAG 1547  
 lys cys asp ile ala leu pro cys ala thr gln asn glu  
 CGC AAC CCT CAG AAC GCT AAG ACT CCT TGT GCA GAC AAC GGC 1586  
 leu asn gln glu asn ala lys thr leu ala asp asn gln  
 TCC GCT TTC GTC GCT GAA GGC CGC AAC ATC CCT TCC ACC 1625  
 cys arg phe val ala glu gln ala asn met pro ser thr

FIG. 17 (2eme planche)

CCA GAG GCT GTT GAG GTC TTC CGT GAG CGC GAC ATC CGC 1664  
 pro glu ala val glu val phe arg glu arg asp ile arg  
 TTC GGA CCA GGC AAG GCA GCT AAC GCT GGT GGC GTT GCA 1703  
 phe gln phe gly lys ala ala asn ala gln gln val ala  
 ACC TCC GCT CTG CAG ATG CAG AAC GCT TCG CGC GAT 1742  
 thr ser ala leu glu met gln gln asn ala ser arg asp  
 TCC TGG ACC TTC GAG TAC ACC GAC GAG CGC CTC CAG GTG 1781  
 ser trp ser phe glu tyr the asp glu arg leu gln val  
 ATC ATG AAG AAC ATC TTC AAG ACC TGT GCA GAG ACC GCA 1820  
 ile met lys asn ile phe lys thr cys ala glu thr ala  
 GCA GAG TAT GGA CAC GAG AAC GAT TAC GTT GTC CGC GCT 1859  
 ala glu tyr gln his glu asn asp tyr val val gln gln  
 AAC ATT CCT GGC TTC AAG AAC GTC GCT GAC CGC ATG CTG 1898  
 asn ile ala gln phe lys lys val ala asp ala met leu  
 GCA CAG CGC GTC ATC TAA GACCCCTGACTTTACTTAAACCCCTGA 1944  
 ala gln gln phe val ile OCH  
 TCCCGCTTAAGGATCAGGGATTTTGATTTCTCCAGGTCAATTATCCGATC 1996  
 CACATGGTTTAATGCAAGCTGTCGGGTGGCAAAATGATCACCGTGGTGTCT 2048  
 TAAACGCTGGCCAGACTCTGGGAAAGATCCTGGTGTATTGAGGCCATCTGGT 2100  
 GGCTGGTGGCTTCATCGACAAATCAGTACCTGAGGGGTCGGTGCACAGCAGC 2152  
 CGCCAGGCAGAGCCGTTGTTGCTGTCGGCCAGATAGGC 2190

FIG. 17 (3eme planche)



**FIG.18**

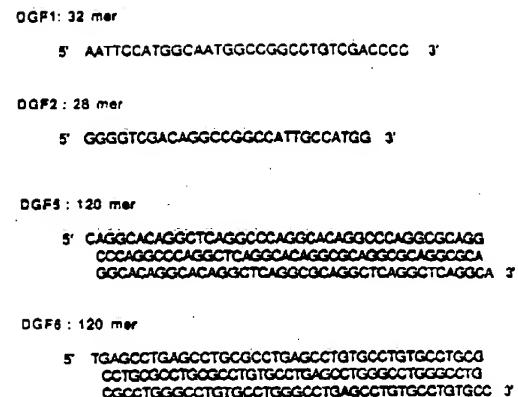


FIG 19

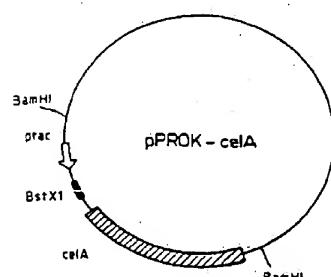


FIG. 20A

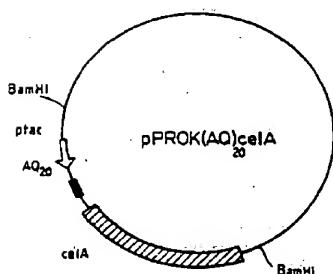


FIG.20B

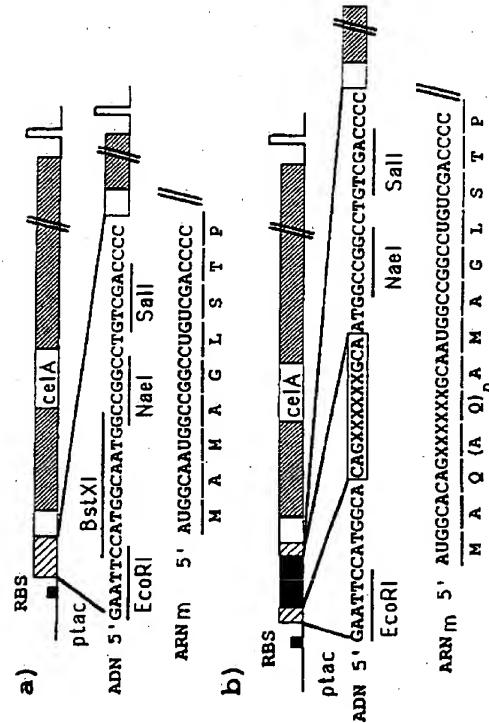


FIG. 21

特表平6-502548 (31)

手 基 楠 正 楠

平成 5 年 6 月 22 日

特許厅長官　麻　生　　樹　　策

1 事件の表示  
平成 5年 特許権 第 503324号  
PCT/EP 92/00744

2 発明の名称 特殊な電気回路の発明によるものであります。

### 3. 精正をする者

特許出願人

オルサン  
4 代理 人 ( 郵便番号 100 )  
東京都千代田区丸の内三丁目2番3号  
[ 電話東京 (3211) 2321 大代表 ]

6428

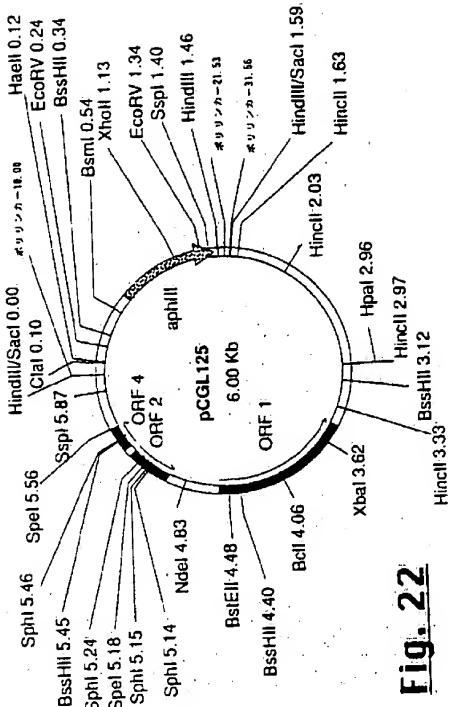
5 横山の日記

## 二 横手の競争

特許法第184条の5第1項の状況及び

明莊書人約法經

1) 部紙の通り  
2) 明細書、請求の範囲、要約書の抄書



**Fig. 22**

C (Continuation): DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/FR 92/00144
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
A	BIO/TECHNOLOGY vol. 30, no. 1, JANUARY 1991, NATURE AMERICA, INC., NEW YORK, US pages 84 - 87 A. SCHWARZER AND A. PUBLIS "Manipulation of <i>Octynobacterium glutamicum</i> by gene disruption and replacement" .....	1-34

国際調査報告

FR 9200744  
SA 63234

This sheet lists the Patent Family members relating to the subject identifiable data in the above-mentioned International search report.  
The numbers are not mentioned in the European Patent Office (EPO) file no.  
The European Patent Office is in no way liable for those particulars which are merely given for the purpose of information. 29/10/92

Patent document date in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO-A-88039821	15-12-88	US-A- 4965197	23-10-90
FR-A-2575492	04-07-86	JP-A- 61268185	27-11-86

For more details about this issue, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/83

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5 識別記号 庁内整理番号

C 12 N 15/90	
C 12 P 21/00	8214-4B
21/08	8214-4B
//(C 12 N 1/21	
C 12 R 1:13)	
(C 12 N 1/21	
C 12 R 1:15)	
(C 12 P 21/00	
C 12 R 1:13)	
(C 12 P 21/00	
C 12 R 1:15)	

(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, D E,  
D K, E S, F R, G B, G R, I T, L U, M C, N  
L, S E), J P, U S

(72) 発明者 レブロン, ジェラール  
フランス国レ, ジュリ, アレー, デ, パー  
ト, 5

(72) 発明者 デュシロン, フランシス  
フランス国アポン, リュ, メルモ, 25, レ  
ジダンス, ラ, フォンテーヌ, オ, ポワ

(72) 発明者 ルノー, ミシェル  
フランス国レ, ジュリ, リュ, デ, コー  
ス, 23